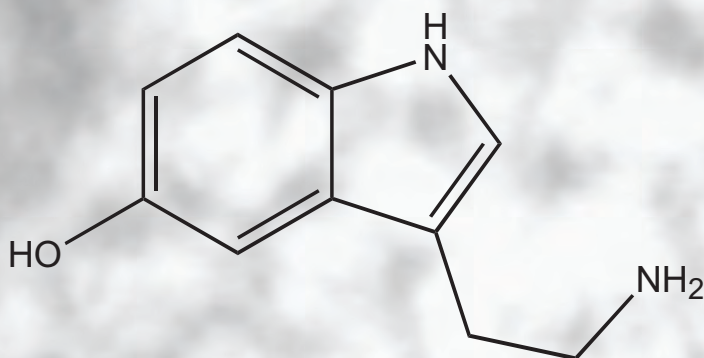


# Die Rolle der organischen Kationentransporter OCT1, OCT2 und OCT3 bei der Serotonin- induzierten Bronchokonstriktion der Maus

**SIBEL AKINCI**



## **INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**édition scientifique**  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer Prof. Dr. M. Bergmann  
und  
dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer Prof. Dr. W. Kummer

**Die Rolle der organischen Kationentransporter OCT1,  
OCT2 und OCT3 bei der Serotonin-induzierten  
Bronchokonstriktion der Maus**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

Zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Sibel Akinci**

Tierärztin aus Izmir / Türkei

Gießen 2006

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. M. Bergmann  
Prof. Dr. W. Kummer

Tag der Disputation: 25.09.2006

Nach § 10 (5) der Promotionsordnung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen:

"Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten."

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2003 bis Januar 2005 im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.

Besonders danke ich Herrn Professor Dr. Wolfgang Kummer für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit, seinem Interesse an ihrem am Fortgang sowie seiner steten wissenschaftlichen und menschlichen Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Martin Bergmann für seine Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts, deren fachliche und menschliche Unterstützung zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat, für die freundschaftliche Zusammenarbeit und den unerschütterlichen Optimismus während der gemeinsamen Zeit im Videomorphometrie-Labor.

***Meiner Familie***

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>16</b>
2.1	Familiäre Zuordnung der organischen Kationentransporter .....	16
2.2	Klonierung der organischen Kationentransporter.....	16
2.2.1	Struktur der organischen Kationentransporter .....	18
2.3	Lokalisation der organischen Kationentransporter.....	18
2.4	Funktion der organischen Kationentransporter .....	20
2.4.1	Aufgaben in der Leber.....	20
2.4.2	Aufgaben in der Niere .....	21
2.4.3	Weitere Aufgaben in ZNS, PNS, Herz, Darm und Plazenta.....	21
2.5	Transportsubstrate der organischen Kationentransporter .....	22
2.5.1	Substrataffinität der organischen Kationentransporter .....	23
2.5.2	Uptake-1 und -2 Transportsysteme .....	23
2.5.3	Genetische Variabilität der organischen Kationentransporter .....	24
2.6	Organische Kationentransporter-Knockout-Modelle.....	24
2.6.1	Studien mit OCT1 <sup>-/-</sup> -Tieren .....	25
2.6.2	Studien mit OCT2 <sup>-/-</sup> -Tieren .....	25
2.6.3	Studien mit OCT1/2 <sup>-/-</sup> -Tieren .....	25
2.6.4	Studien mit OCT3 <sup>-/-</sup> -Tieren .....	26
2.7	Involvierung der organischen Kationentransporter in das non-neuronale cholinerge System .....	27
2.8	Neuronale cholinerge Regulation.....	29
2.9	Interaktion der organischen Kationentransporter mit Serotonin .....	30
2.10	Ziel der Arbeit .....	31
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>32</b>
3.1	Material.....	32
3.1.1	Pharmaka .....	32



3.1.2	Lösungen .....	33
3.1.3	Tiere .....	34
<b>3.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>35</b>
3.2.1	Präparation der Mäuselunge .....	35
3.2.2	Anfertigen der Lungenpräzisionsschnitte .....	36
3.2.3	Videomorphometrie .....	37
3.2.4	Auswertung .....	40
3.2.5	Statistik .....	41
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>42</b>
<b>4.1</b>	<b>Versuchsreihen mit PCLS von OCT1/2<sup>-/-</sup>-, OCT3<sup>-/-</sup>- und korrespondierenden WT-Mäusen (FVB) .....</b>	<b>42</b>
4.1.1	Muskarin- ( $10^{-6}$ M) und 5-HT- ( $10^{-6}$ M) induzierte Bronchokonstriktion .....	42
4.1.2	Versuchsreihe mit Atropin ( $10^{-4}$ M) .....	45
4.1.3	Versuchsreihe mit Corticosteron ( $10^{-6}$ M) .....	47
4.1.4	Versuchsreihe mit Quinin ( $10^{-4}$ M) .....	49
<b>4.2</b>	<b>Versuchsreihe mit PCLS von MR2/3<sup>-/-</sup>- und korrespondierenden WT-Mäusen .....</b>	<b>52</b>
4.2.1	Muskarin- ( $10^{-6}$ M), 5-HT- ( $10^{-6}$ M) und U-46619- ( $10^{-5}$ M) induzierte Bronchokonstriktion .....	52
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>56</b>
<b>5.1</b>	<b>Methodische Aspekte .....</b>	<b>56</b>
5.1.1	Verwendung von PCLS .....	56
5.1.2	Mikroskopie und Auswertung der PCLS .....	57
5.1.3	Eignung der PCLS für pharmakologische Studien .....	57
<b>5.2</b>	<b>Cholinerge Komponente der Serotonin-induzierten Bronchokonstriktion .....</b>	<b>58</b>
5.2.1	Versuchsreihe mit MR-Subtypen 2- und 3-defizienten PCLS .....	59
<b>5.3</b>	<b>Beteiligung der OCT-Subtypen OCT1 und OCT2 an der Bronchokonstriktion .....</b>	<b>61</b>
<b>5.4</b>	<b>Beteiligung des OCT-Subtyps OCT3 an der Bronchokonstriktion .....</b>	<b>62</b>
<b>5.5</b>	<b>Inhibitorischer Effekt von Atropin .....</b>	<b>63</b>
<b>5.6</b>	<b>Inhibitorischer Effekt von Quinin .....</b>	<b>64</b>
<b>5.7</b>	<b>Schlussfolgerung .....</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>67</b>

<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>71</b>

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht Pharmaka .....	32
Tabelle 2: Qualitätskriterien der verwendeten Lungenschnitte .....	38
Tabelle 3: Versuchsprotokoll OCT <sup>-/-</sup> -Tiere .....	40
Tabelle 4: Versuchsprotokoll MR2/3 <sup>-/-</sup> -Tiere .....	40
Tabelle 5: minimale luminale Fläche [%] nach Muskarin- (1 µM) bzw. 5-HT- Applikation (1 µM) bei FVB-, OCT1/2 <sup>-/-</sup> - und OCT3 <sup>-/-</sup> -PCLS .....	54
Tabelle 6: minimale luminale Fläche [%] nach 5-HT- bzw. 5-HT + Inhibitor- Applikation bei FVB-, OCT1/2 <sup>-/-</sup> -, OCT3 <sup>-/-</sup> -PCLS.....	55

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der Transporter der Familie SLC22 des Menschen (modifiziert nach [20]).....	17
Abbildung 2: Hypothetisches Modell des hOCT1 (modifiziert nach [34]).....	18
Abbildung 3: Transportsysteme für OC in Hepatozyten (modifiziert nach [15])	20
Abbildung 4: Transportsysteme für OC in proximalen Nierentubuli (modifiziert nach [15]) .....	21
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Inkubationskammer.....	37
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Videomorphometriearbeitsschritte .....	39
Abbildung 7: PCLS mit Bronchus vor (A) und 1 Minute nach Muskarinapplikation (B) .....	41
Abbildung 8: Graphische Darstellung der luminalen Bronchusfläche nach Muskarin- (1 $\mu$ M) und 5-HT-Applikation (1 $\mu$ M) bei PCLS von FVB-, OCT1/2 <sup>-/-</sup> - und OCT3 <sup>-/-</sup> -Tieren. ....	44
Abbildung 9: Boxplots der 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion angegeben als Prozentzahl der Muskarin-induzierten .....	44
Abbildung 10: Graphische Darstellung der Versuchsreihe mit Atropin. ....	46
Abbildung 11: Graphische Darstellung der Versuchsreihe mit Corticosteron. ...	48
Abbildung 12: Graphische Darstellung der Versuchsreihe mit Quinin .....	50
Abbildung 13: Boxplots der 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion in Anwesenheit von Atropin ( $10^{-4}$ M), Corticosteron ( $10^{-6}$ M) und Quinin ( $10^{-4}$ M) bei FVB-, OCT1/2 <sup>-/-</sup> - und OCT3 <sup>-/-</sup> -Bronchi. ....	51
Abbildung 14: Graphische Darstellung der Versuchsreihe mit PCLS von MR2/3 <sup>-/-</sup> und MR2/3 <sup>+/+</sup> -Tieren .....	53

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ACh</b>	Acetylcholin
<b>ChAT</b>	Cholin-Acetyltransferase
<b>CHT1</b>	Cholin-Transporter 1
<b>cm</b>	Zentimeter
<b>Da</b>	Dalton
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>EMT</b>	extraneuronaler Monoamintransporter
<b>g</b>	Gramm
<b>h</b>	Stunde
<b>Hz</b>	Hertz
<b>I.E.</b>	Internationale Einheiten
<b>Ko</b>	Knockout
<b>K<sup>+</sup></b>	Kalium
<b>l</b>	Liter
<b>M</b>	Molar
<b>μM</b>	Mikromolar
<b>μg</b>	Mikrogramm
<b>μl</b>	Mikroliter
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mm</b>	Millimeter
<b>MPP<sup>+</sup></b>	1-Methyl-4-Phenylpyridinium
<b>MR</b>	muskarinischer Acetylcholinrezeptor
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>Na<sup>+</sup></b>	Natrium
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>n</b>	Anzahl
<b>OC</b>	Organische Kationen
<b>OCT</b>	Organischer Kationentransporter
<b>PCLS</b>	Precision-Cut Lung Slices
<b>PCR</b>	Polymerase Kettenreaktion
<b>PNS</b>	Peripheres Nervensystem

<b>RNA</b>	Ribonucleinsäure
<b>mRNA</b>	messenger Ribonucleinsäure
<b>s</b>	Sekunde
<b>SLC</b>	solute carrier
<b>S. D.</b>	Standardabweichung
<b>TEA</b>	Tetraethylammonium
<b>TMD</b>	Transmembrandomäne
<b>VACht</b>	Vesikulärer Acetylcholin-Transporter
<b>WT</b>	Wildtyp
<b>5-HT</b>	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
<b>5-HTT</b>	Serotonintransporter
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

Der Entzündungsmediator und Monoamin-Neurotransmitter Serotonin (5-HT) führt in vielen Säugetieren einschließlich Mäusen zu einer Bronchokonstriktion, jedoch nicht bei gesunden oder an Asthma erkrankten Menschen [1]. Mäuselungen reagieren sowohl auf 5-HT als auch auf Acetylcholin (ACh) mit einer Bronchokonstriktion. Eine Hemmung der 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion ist früheren Untersuchungen zufolge in Mäusen dosisabhängig mit dem Muskarinrezeptorantagonisten Atropin möglich [1, 2]. Zudem erweist sich die Kontraktion in Mäuseatemwegen sensitiv gegenüber Blockade sowohl muskarinischer als auch 5-HT-Rezeptoren [1]. Eine von Moffatt et al. [3] durchgeführte Studie am Modell der Mäusetrachea zeigte ebenfalls, dass Atropin dosisabhängig die 5-HT-induzierte Kontraktion der Trachea inhibierte und, dass nach Entfernen des Epithels eine Reduktion der Kontraktion erfolgte. Neurotoxine wie das Botulinustoxin dagegen bewirkten keine Beeinflussung der 5-HT-induzierten Kontraktion [3]. Basierend hierauf stellte die Arbeitsgruppe um Moffatt et al. [3] die Hypothese auf, dass die Stimulation des epithelialen 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptors die Freisetzung von ACh aus dem Trachealepithel induziert.

Säugetiere besitzen in den Atemwegen sowohl ein neuronales als auch ein non-neuronales cholinerges System [4]. ACh, dessen Synthese-Enzym Cholin-Acetyltransferase (ChAT) und der hoch-affine Cholin-Transporter (CHT1) finden sich in vielen non-neuronalen Zellen wie Epithel-, Endothel-, Mesothel- und Immunzellen sowie glatten Muskelfasern, auf welchen wiederum nikotinische und muskarinische ACh-Rezeptoren vorkommen [5, 6, 7]. Während in den cholinergen Nervenendigungen die Mechanismen und molekularen Bestandteile der ACh-Synthese, -Speicherung, -Freisetzung, -Spaltung und Wiederaufnahme der Spaltprodukte bekannt sind, sind die des non-neuronalen cholinergen Systems der Atemwege bislang wenig erforscht. Die ACh-Synthese in non-neuronalen erfolgt wie in neuronalen Zellen aus Acetyl-CoA und Cholin durch die ChAT. Unklar ist jedoch, mit welchen Mechanismen non-neuronale Zellen ACh in den Extrazellularraum freisetzen. In Ratten enthalten die meisten respiratorischen Epithelzelltypen weder Speichervesikel für ACh noch den Vesikulären ACh-Transporter (VAChT) [8].

Eine mögliche Rolle bei der 5-HT- bzw. ACh-induzierten Bronchokonstriktion spielen die 1994 erstmals klonierten organischen Kationentransporter OCT1, OCT2 und OCT3 [9]. Diese sind in einer Vielzahl von Zellen einschließlich Epithelzellen exprimiert und transportieren sowohl Cholin, als auch ACh und 5-HT in bzw. aus Zellen. Nach einer Veröffentlichung von Lips et al. [8] weisen die meisten Epithelzelltypen der Atemwege OCT auf. Lips et al. [8] berichteten zudem, dass OCT1 und OCT2 in vitro ACh transportieren. Diese Studie bekräftigte die Hypothese von Wessler et al. [10], dass die OCT-Subtypen OCT1 und OCT3 in menschlichen Plazentazotten an der Freisetzung von non-neuronalem ACh beteiligt sind. Resultierend aus diesen Ausgangsüberlegungen entstand die Hypothese, dass die OCT eine 5-HT-induzierte ACh-Freisetzung aus dem Atemwegsepithel vermitteln, infolge dessen eine Bronchokonstriktion entsteht.

Zur Klärung dieser Hypothese diente das Modell der vitalen Lungenpräzisionsschnitte (Precision Cut Lung Slices, PCLS) in Verbindung mit Videomikroskopie und digitaler Bildauswertung. Diese Form der Präparation von Lungengewebe ermöglicht derzeit als einziges Verfahren, die Reaktion der kleinen Luft leitenden Atemwege von Nagern im Gewebeverband darzustellen, welche vergleichbar mit terminalen Bronchioli humaner Lungen sind [13, 14]. Zur Identifikation der Rolle der einzelnen OCT-Subtypen in der Lungenfunktion und insbesondere bei der 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion wurden PCLS von OCT-Knockout-Mäusen verwendet. Die Klärung der cholinergen Komponente erfolgte mit PCLS Muskarinrezeptor-2/3-defizienter Mäuse, welche Struckmann et al. [15] zufolge auf cholinerge Stimulation mit Muskarin keine Reaktion zeigen.



## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Familiäre Zuordnung der organischen Kationentransporter**

Die OCT zählen zu der Transporterfamilie SLC22 (solute carrier), welche wiederum Mitglied der solute carrier (SLC) Superfamilie ist. Diese umfasst beim Mensch ca. 225 Mitglieder und stellt somit derzeit die größte Transportersuperfamilie dar [16]. Während die meisten Transporter der SLC-Familie hoch spezialisiert sind und ausschließlich essenzielle Nährstoffe wie Glucose, Aminosäuren, Nucleoside oder Fettsäuren transportieren, und folglich als oligospezifisch benannt werden, gibt es daneben einige Transporter, die eine größere Bandbreite an Substraten aufweisen. Diese transportieren strukturell verschiedene Substanzen und werden als polyspezifisch bezeichnet [16]. Bislang gehören zu der Transporterfamilie SLC drei ATP-unabhängige Familien mit polyspezifischen Transportern. Hierzu zählen die Familie SLC15 ( $H^+$ -Oligopeptid Kotransporterfamilie), die Anionentransporterfamilie SLC21 und die bereits genannte Familie SLC22 (Organische Anionen-Kationen-Zwitterionen Transporterfamilie) [17]. Neben den Organischen Kationentransportern OCT1-3 beinhaltet die SLC22-Familie noch weitere Mitglieder wie die Zwitterionen-/Kationentransporter OCTN1-2 mit CT2 (Carnitin u./o. Kationen), die Organischen Anionentransporter OAT1-4, einen Urattransporter URAT1 sowie sechs weitere Genprodukte undefinierter Funktion [16, 17].

### **2.2 Klonierung der organischen Kationentransporter**

Die Identifizierung des ersten Mitgliedes der OCT-Familie OCT1 erfolgte 1994 aus der Niere einer Ratte [9]. Diese Anfangsstudie zeigte, dass rOCT1 (rat OCT1) ähnliche funktionelle Eigenschaften aufweist wie ein zuvor beschriebener Transportprozess für organische Kationen in der basolateralen Membran proximaler Nierentubuli und von Hepatozyten [16]. rOCT1 stellt eine Peptidkette bestehend aus 556 Aminosäuren dar, welche die Membran

zwölfmal durchquert [16]. Weitere Klonierung des OCT1 erfolgte bislang aus Mäusen [18], Menschen [19] und Kaninchen [20].

Das zweite Mitglied der OCT-Familie, OCT2, wurde erstmals 1996 wie auch OCT1 aus einer Rattenniere isoliert [21] und konnte nachfolgend in Menschen [19], Schweinen [22], Mäusen [23] und Kaninchen [24] nachgewiesen werden. OCT2 umfasst 593 Aminosäuren mit einem molekularen Gewicht von 66 kDa und weist eine 67 %ige Homologie zu dem OCT1 auf [16].

Die Identifikation des OCT3 als drittes Mitglied der OCT-Familie erfolgte 1998 unabhängig voneinander durch zwei unterschiedliche Gruppen aus der Ratte und aus dem Menschen [25-27] und ein Jahr später durch Verhaagh et al. [28] aus der Maus. rOCT3 setzt sich aus 551 Aminosäuren zusammen und besitzt eine Molekülmasse von 61 kDa, ist jedoch nur zu 41 % identisch mit OCT1 [26].

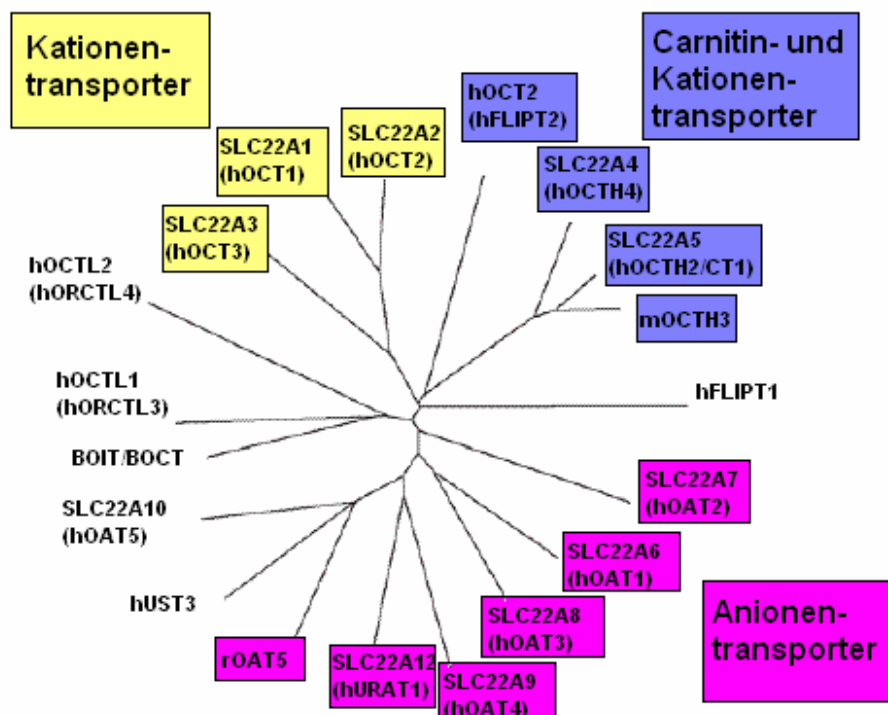


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der Transporter der Familie SLC22 des Menschen (modifiziert nach [29])

### 2.2.1 Struktur der organischen Kationentransporter

Die Struktur der OCT besteht wie bei den meisten Mitgliedern der SLC22-Familie aus einer Peptidkette, welche die Membran zwölfmal durchquert. Diese als Transmembran-Domänen (TMD) bezeichneten Aminosäuresequenzen sind zu  $\alpha$ -Helices spiralisiert. Zwischen TMD 1 und 2 zeigt sich eine große extrazelluläre Schleife mit Glykosylierungsstellen und zwischen TMD 6 und 7 ragt eine große Phosphorylierungsstellen beinhaltende Schleife in das Zellinnere. Sowohl das N- als auch das C-terminale Ende befinden sich intrazellulär [16, 17].

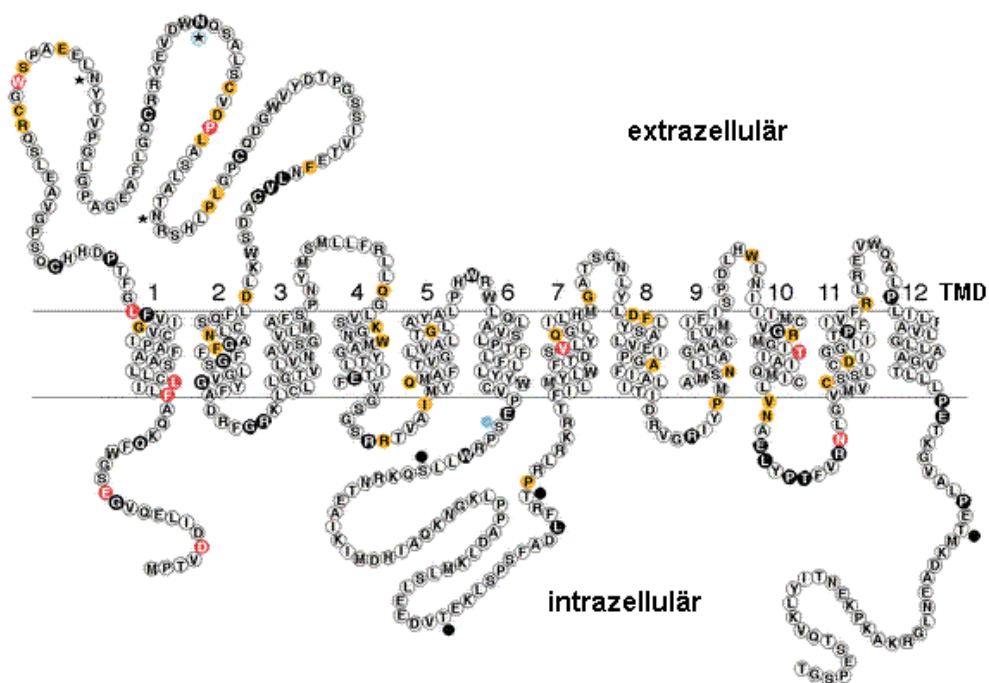


Abbildung 2: Hypothetisches Modell des hOCT1 (modifiziert nach [30])

### 2.3 Lokalisation der organischen Kationentransporter

Die Transporter der OCT-Familie sind in der Plasmamembran epithelialer Zellen exprimiert [16, 17, 31], wobei sich sowohl zwischen den drei Subtypen als auch in Abhängigkeit von der Spezies Unterschiede im Verteilungsmuster zeigen. Northern Blot und RNA in situ Hybridisation zeigten, dass OCT1 mRNA beim Menschen v.a. in der Leber zu finden ist und zu geringerem Maß in Herz,

Skelettmuskulatur, Niere, Plazenta und Dünndarm. Im Gegensatz dazu exprimieren Nager den OCT1 vornehmlich in Leber, Niere und Dünndarm, aber auch in Dickdarm, Haut, Milz, Plexus choroideus und Neuronen [17].

Der OCT2 ist bei Nagern und Menschen primär in der Niere exprimiert, findet sich aber auch in Plazenta, Thymus, Nebenniere, Plexus choroideus und Neuronen. Nach Urakami et al. [32, 33] und Slitt et al. [34] ist die Expression des OCT2 in der Niere geschlechts- und altersabhängig [16], wodurch geschlechtsbedingte Unterschiede in der renalen Ausscheidung organischer Kationen auftreten. Nieren männlicher Ratten weisen eine signifikant höhere Expression von OCT2 mRNA auf als Nieren weiblicher Ratten [32]. Slitt et al. [34] berichteten zusätzlich von einer altersabhängigen Expression des OCT2 in der Rattenniere. Während bis zum 30. Lebenstag bei beiden Geschlechtern ähnliche Level an OCT2 mRNA messbar waren, zeigten männliche Ratten ab diesem Zeitpunkt im Vergleich zu weiblichen einen starken Anstieg von OCT2 mRNA. Die Applikation des männlichen Sexualhormones Testosteron führte bei beiden Geschlechtern zu einem Anstieg der rOCT2-Expression. Behandlung mit dem weiblichen Sexualhormon Estradiol hatte nur bei männlichen Tieren einen Abfall an OCT2 mRNA zur Folge [33]. Bei Untersuchungen mit kastrierten männlichen Ratten exprimierten die Nieren beider Geschlechter ungefähr gleiche OCT2-Zahlen [34].

Die Klonierung des OCT3 erfolgte bislang aus mehreren unterschiedlichen Geweben. OCT3 ist in Skelettmuskulatur und glatter Muskulatur, in Leber, Plazenta, Niere, Herz, Darm, Milz, Lunge, Gehirneuronen, sympathischen Ganglien, Gliazellen und dem Plexus choroideus nachweisbar [16, 17, 29].

Immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass die OCT in der Leber in der sinusoidalen Membran der Hepatozyten lokalisiert sind, während sie sich in der Niere in der basolateralen Membran der proximalen Nierentubuli und im Dünndarm in der basolateralen Membran von Enterozyten befinden [16, 17, 29].

## 2.4 Funktion der organischen Kationentransporter

Aufgrund ihrer breiten Substratspezifität und der Lokalisation in den wichtigsten exkretorischen Organen besteht die Annahme, dass die OCT eine entscheidende Rolle bei der Beseitigung kationischer Toxine und Abfallprodukte spielen [35]. Sie vermitteln die erleichterte Diffusion in und aus der Zelle von strukturell verschiedenen organischen Kationen einschließlich der Monoamin-Neurotransmitter und vieler Pharmaka [17]. Die Homöostase solcher organischer Kationen wird einerseits durch deren endogene Produktion und andererseits durch ihre Absorption im Dünndarm und ihre Ausscheidung in Darm, Leber und Niere bestimmt [36].

### 2.4.1 Aufgaben in der Leber

Die physiologische Funktion der OCT in der Leber liegt vermutlich in der Vermittlung des ersten Schritts der Exkretion, nämlich der Aufnahme von Kationen in die Hepatozyten über die sinusoidale Membran. An diesem Vorgang ist entsprechend seiner Gewebeverteilung vor allem der OCT1 beteiligt. Die Ausscheidung der aufgenommenen Kationen aus den Hepatozyten in den Gallengangskanal erfolgt durch bisher nicht identifizierte polyspezifische  $H^+$ -Kationenantiporter und/oder dem P-Glycoprotein MDR-1. Da die organischen Kationen in beide Richtungen transportiert werden können, ist sowohl deren Aufnahme als auch deren Freisetzung möglich [17].

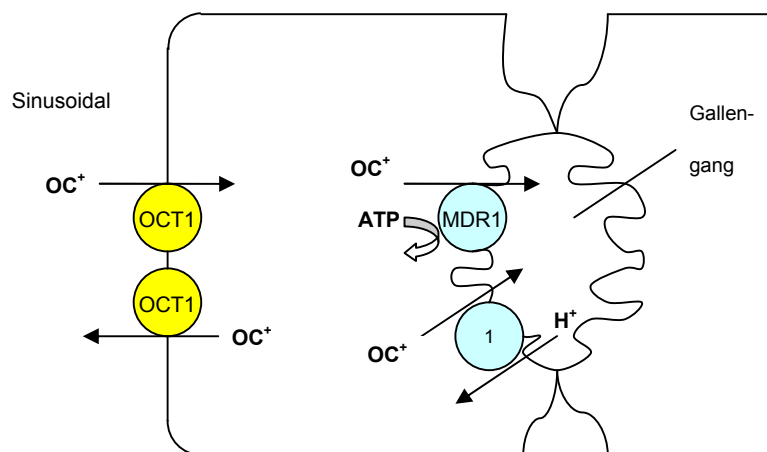


Abbildung 3: Transportsysteme für OC in Hepatozyten (modifiziert nach [17])

### 2.4.2 Aufgaben in der Niere

Ähnlich wie der OCT1 in der Leber spielt der OCT2 in der Niere eine wichtige Rolle beim ersten Schritt renaler Ausscheidung von Kationen. Hierbei ist er für die Aufnahme organischer Kationen durch die basolaterale Membran proximaler Tubuluszellen verantwortlich. Die darauf folgende luminal Abgabe erfolgt über einen bislang nicht identifizierten  $H^+$ -Kationenaustauscher, über den OCTN1 und einen  $Na^+$ -Carnitin-Kotransporter (OCTN2) [17]. In den Glomeruli gefilterte organische Kationen, wie z.B. Cholin, können im proximalen Tubulus resorbiert werden, wobei der Transport durch die luminal Membran mittels eines bislang unbekannten elektrogenen Kationentransporters geschieht. Die Ausscheidung aus den Tubuluszellen ist wiederum OCT2 vermittelt [17].

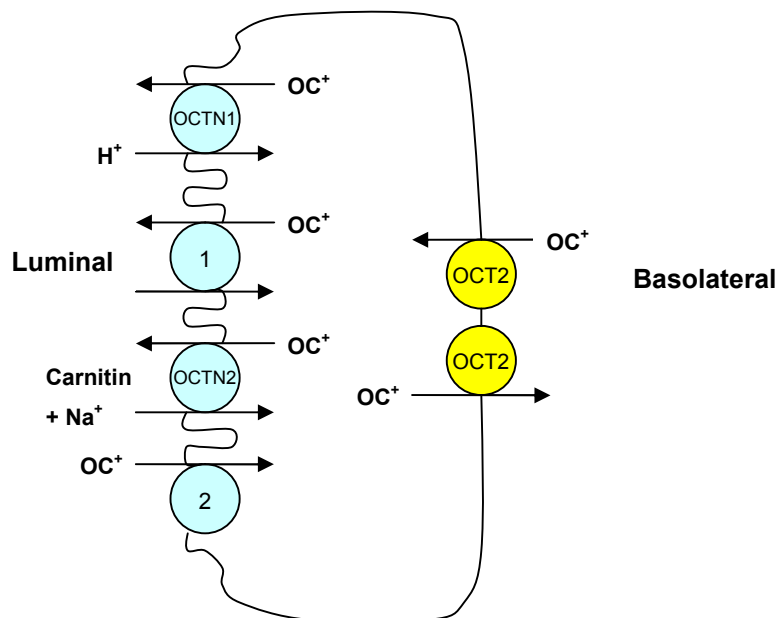


Abbildung 4: Transportsysteme für OC in proximalen Nierentubuli (modifiziert nach [17])

### 2.4.3 Weitere Aufgaben in ZNS, PNS, Herz, Darm und Plazenta

Zusätzlich zur Absorption von Pharmaka und Xenobiotika im Dünndarm und deren Exkretion über Leber, Darm und Niere, sind die OCT auch an der Resorption und Ausscheidung endogener Verbindungen wie Cholin, Dopamin und Guanidin beteiligt [17]. So bewirken sie in ZNS, PNS und im Herz [29] eine Reduktion der interstitiellen Konzentration von Monoamin-Neurotransmittern, von ACh, Cholin, 5-HT und Agmatin [17]. In Darmneuronen sind sie an der 5-HT-Resorption aus dem Darmlumen beteiligt, welches aus enterochromaffinen

Zellen freigesetzt wird und zu vermehrter Peristaltik und Sekretion führt [12]. Horvath et al. [37] zeigten, dass der OCT-Subtyp OCT3 nach sympathischer Stimulation glatter Muskelzellen in menschlichen Bronchialarterien Noradrenalin aus dem Extrazellularraum abtransportiert und die Arbeitsgruppe Wessler et al. [10] belegte mit Untersuchungen an humanen Plazentarzotten, dass OCT1 und/oder OCT3 vermutlich ACh freisetzen.

## **2.5 Transportsubstrate der organischen Kationentransporter**

OCT transportieren mittels eines vom  $H^+$ - und  $Na^+$ -Gradienten unabhängigen Diffusionsmechanismus bei physiologischem pH-Wert organische Kationen (OC) elektrogen durch die Plasmamembran in beide Richtungen [16, 17, 38]. Die Bestimmung der Transportrichtung erfolgt hierbei einerseits durch den Konzentrationsgradienten des transportierten Substrates und andererseits durch das Membranpotenzial [17, 29, 31]. Die Größe der zumeist hydrophilen, aber auch einiger hydrophoben Substrate, beträgt zwischen 60 und 350 Da. Als organische Kationen werden organische Moleküle, die eine oder mehrere primäre, sekundäre, tertiäre oder quartäre Ammoniumgruppen besitzen und eine zeitweise oder permanente positive Ladung aufweisen, bezeichnet [16, 17, 31]. Hierzu zählen endogene organische Kationen wie Cholin,  $N^1$ -Methylnicotinamid (NMN), Monoamin-Neurotransmitter wie Dopamin, 5-HT, Histamin und die Katecholamine, Xenobiotika, Neurotoxine wie 1-Methyl-4-Phenylpyridinium ( $MPP^+$ ), einige Vitamine und Pharmaka vieler klinischer Klassen einschließlich Antihistaminika, Skelettmuskelrelaxanzien, Antiarrhythmika, Antidiabetika und  $\beta$ -adrenerge Rezeptorblocker [16, 17, 31]. Die Tatsache, dass hOCT1 (human OCT1) und hOCT2 auch den Transport einiger anionischer Prostaglandine wie  $PGE_2$  vermitteln, zeigt, dass eine positive Ladung keine zwingende Voraussetzung für Substrate der OCT darstellt [16, 39].

### **2.5.1 Substrataffinität der organischen Kationentransporter**

Trotz sich breit überschneidender Substratspezifitäten der OCT zeigen sich sowohl zwischen den drei Subtypen als auch zwischen den Spezies untereinander Unterschiede in Affinität und Transportrate. So weisen zum Beispiel hOCT1 und 2 im Gegensatz zu hOCT3 eine sehr hohe Affinität für das organische Modellkation Tetraethylammonium (TEA) auf [17]. Für die halb-maximale Inhibition mit dem Inhibitor Corticosteron sind beim Menschen Konzentrationen von  $\sim 10 \mu\text{M}$  für OCT1,  $\sim 30 \mu\text{M}$  für OCT2 und  $\sim 0,1 \mu\text{M}$  für OCT3 nötig, wohingegen bei der Ratte die halb-maximale Inhibition für OCT3 mit  $\sim 5 \mu\text{M}$  erreicht wird [17]. Ähnliche Affinität zu allen drei OCT-Subtypen besitzen dagegen  $\text{MPP}^+$  und die körpereigenen Substanzen 5-HT, Noradrenalin, Histamin und Agmatin.

### **2.5.2 Uptake-1 und -2 Transportsysteme**

Die OCT spielen eine Rolle in der Beseitigung endogener Kationenverbindungen wie den biogenen Amino-Neurotransmittern, zu welchen die Katecholamine (Dopamin, Epinephrin, Norepinephrin), 5-HT und Histamin zählen [16]. Die Wiederaufnahme der Katecholamine, die via Exozytose aus den sympathischen Neuronen freigesetzt werden, erfolgt durch zwei unterschiedliche Aufnahmesysteme, Uptake-1 und Uptake-2 [16, 40].

Das neuronale  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -abhängige System Uptake-1 befindet sich an präsynaptischen Nervenendigungen und besteht aus dem Norepinephrintransporter SLC6A2 und dem Dopamintransporter SLC6A3, beides Mitglieder der Transporterfamilie SLC [16, 40]. Uptake-2, das sogenannte extraneuronale Transportsystem, ist im peripheren non-neuronalen Gewebe für die Katecholaminaufnahme verantwortlich [11, 40]. Die Identifizierung des extraneuronalen Monoamintransporters (EMT), welcher dem Uptake-2 zugeordnet wird, erfolgte 1965 am isolierten Rattenherz durch Iversen [41]. Da der 1998 erstmals unabhängig voneinander durch zwei Gruppen klonierte OCT3 eine gleiche Sensitivität gegenüber einigen Inhibitoren wie der EMT zeigte, wurde er diesem gleichgesetzt [17, 25, 27]. Aufgrund der Tatsache, dass der OCT3 jedoch nicht ausschließlich in extraneuronalen Geweben, sondern auch in Neuronen des Hippocampus und in Purkinjezellen des



Kleinhirns [27] nachgewiesen wurde und sowohl OCT1 als auch OCT2 ebenso Monoamine wie 5-HT mit ähnlicher Affinität wie OCT3 transportieren, sollte die Bezeichnung des OCT3 als EMT kritisch betrachtet werden [17, 30, 42].

### **2.5.3 Genetische Variabilität der organischen Kationentransporter**

Verschiedene Autoren berichten über das Vorkommen polymorpher genetischer Variabilität bei Mitgliedern der OCT-Familie [43-48]. Im Gencode des OCT1 konnten zahlreiche Polymorphismen einzelner Nukleotide (single-nucleotide polymorphisms, SNPs) nachgewiesen werden, die zum Teil in der Substitution von Aminosäuren resultierten. Traten die Mutationen in der großen extrazellulären Schleife zwischen TMD 1 und 2 oder der intrazellulären zwischen TMD 6 und 7 bzw. in der kleinen intrazellulären Schleife zwischen TMD 10 und 11 und TMD 7 und 8 oder in der vierten TMD auf, zeigte sich eine verminderte Transportaktivität des OCT1. Derartige Mutationen mit geringerer Transportrate und/oder veränderter Substratselektivität beeinflussten die hepatische Exkretion kationischer Pharmaka und die Exposition toxischer Stoffe in der Leber [17]. Ähnlich dem OCT1 fanden Leabman et al. [45] SNPs im genetischen Code des OCT2 und Lazar et al. [44] stellten mehrere SNPs beim OCT3 fest [16]. Basierend auf solchen genetischen Abweichungen, die die Pharmakokinetik von Medikamenten beeinflussen, lassen sich die individuell unterschiedlichen Reaktionen auf ein Medikament erklären.

## **2.6 Organische Kationentransporter-Knockout-Modelle**

Die Identifizierung der Funktion der einzelnen OCT-Subtypen gestaltete sich in Folge der sich überschneidenden Gewebeverteilung der OCT-Subtypen einerseits und der oligospezifischen organischen Kationentransporter wie der Na<sup>+</sup>-abhängige Monoamin-Neurotransmitter-Transporter und der Transporter für Cholin, ACh und Thiamin andererseits als schwierig. Aus dieser Problematik heraus züchteten Jonker und Zwart et al. [16] Knockout-Mäuse (OCT<sup>-/-</sup>-Mäuse) mit defizientem OCT1, OCT2 oder OCT3 [17, 35, 40, 49]. Diese sind

lebensfähig, fertil und gesund und weisen keine offensichtlichen phenotypischen Anomalitäten auf. Verschiedene Studien mit Ko-Tieren zeigten jedoch, dass die Deletion der OCT die Pharmakokinetik von OC beeinflusst [16].

### **2.6.1 Studien mit OCT1<sup>-/-</sup>-Tieren**

Nach einer im Jahr 2001 von Jonker et al. [16] durchgeführten Studie stellt der OCT1 in der Leber das sinusoidale Hauptresorptionsmolekül für TEA dar. Nach intravenöser TEA-Injektion wies die Leber von OCT1<sup>-/-</sup>-Mäusen verglichen mit der des Wildtyps (WT) eine um 85 % nach 20 Min. bzw. 77 % nach 60 Min. reduzierte Konzentration von TEA auf [49, 50]. Zusätzlich bewirkte das Fehlen von OCT1 in der Leber eine erhöhte renale Elimination, statt wie erwartet eine verminderte [49]. Im Dünndarm OCT1-defizienter Mäuse zeigte sich eine um ca. 50 % verminderte Abgabe von TEA. OCT1 transportiert demzufolge TEA an der basolateralen Membran in die Enterozyten, aus welchen es ins Darmlumen sezerniert wird [49].

### **2.6.2 Studien mit OCT2<sup>-/-</sup>-Tieren**

Das Fehlen des OCT2 hatte einer Veröffentlichung von Jonker et al. [35] zufolge kaum Auswirkung auf die Pharmakokinetik von TEA in Niere, Leber und Dünndarm. Die Arbeitsgruppe um Sweet et al. [38] berichtete, dass der OCT2 im Plexus chorioideus an der Beseitigung von Cholin aus der Zerebrospinalflüssigkeit beteiligt ist und dass die Cholinaufnahme durch Inhibitoren der OCT gehemmt wurde.

### **2.6.3 Studien mit OCT1/2<sup>-/-</sup>-Tieren**

Da weder bei OCT1<sup>-/-</sup> noch bei OCT2<sup>-/-</sup> ein Effekt auf die Ausscheidung von TEA in der Niere festzustellen war, züchtete die Arbeitsgruppe um Jonker 2003 OCT1/2-Doppelknockout-Mäuse (OCT1/2<sup>-/-</sup>-Mäuse) [35]. Bei diesen konnte eine vollständige Elimination der renalen Exkretion von TEA mit gleichzeitig gesteigener Plasmakonzentration des Moleküls beobachtet werden [35]. Die

menschliche Niere exprimiert im Gegensatz zur Nagerniere nur den OCT2 und nicht den OCT1 [51]. Eine Deletion des OCT2 würde daher bei der menschlichen Niere wahrscheinlich zu den Auswirkungen einer Deletion von OCT1 und OCT2 bei Ratten führen [16].

#### **2.6.4 Studien mit OCT3<sup>-/-</sup>-Tieren**

Nach einer Veröffentlichung von Gründemann et al. [25] erfolgt die primäre Expression des OCT-Subtyps OCT3 im Herz. Bei einer von Zwart et al. [40] durchgeführten Studie zeigten OCT3-defiziente Mäuse im Herz nach intravenöser Applikation von MPP<sup>+</sup> eine um 72 % verminderte Konzentration der Substanz im Gegensatz zu dem WT. Im Zuge dieser Untersuchung wurde die MPP<sup>+</sup>-Konzentration nach intravenöser Injektion neben dem Herz auch in weiteren Organen gemessen. In Feten tragender OCT3<sup>-/-</sup>-Mäuseweibchen verglichen mit Feten des WT wurde eine dreifache MPP<sup>+</sup>-Reduktion festgestellt ( $64.7 \pm 22.7$  ng/g MPP<sup>+</sup> im WT gegen  $20.4 \pm 4.4$  ng/g in OCT3<sup>-/-</sup>-Mäusen) [40]. Basierend auf dieser Beobachtung stellten Zwart et al. [40] die Hypothese auf, dass der OCT3 gemeinsam mit dem Enzym Monoaminoxidase A im Embryo produzierte Monoamine eliminiert. Die Tatsache, dass das Fehlen des OCT3 keine Auswirkungen auf andere Organe zeigte, ist auf eine mögliche organspezifische Kompensation durch OCT1 und OCT2 zurückzuführen.

Nach Chen et al. [12] und Schmitt et al. [11] können sowohl h/rOCT3 als auch OCT1 Monoamine wie 5-HT transportieren. Infolge einer Deletion des hochaffinen 5-HT-Transporters (SERT) kommt es nach Chen et al. [12] zu einer kompensatorisch vermehrten Expression von OCT1 in Neuronen des Dünndarms und nach Schmitt et al. [11] von OCT3 im Hippocampus, während die 5-HT-Aufnahme in die Zellen jedoch unverändert bleibt.

Die Bedeutung von OCT3 für die ZNS-Funktion wurde 2004 von Vialou et al. [52] dargestellt. Diesen Autoren zufolge wird OCT3 in Neuronen der Area postrema exprimiert, welche an der Regulation der Salz- und Wasseraufnahme beteiligt ist. Ein Knockout des OCT3 bei Mäusen führt zu einer veränderten Salz- und Wasseraufnahme [52]. OCT3 kommt auch in Zellen glatter Muskulatur vor, wie zum Beispiel in der glatten Muskulatur von Bronchialarterien. Nach Horvath et al. [37] ist OCT3 in die

Norepinephrinaufnahme involviert, was zum Abbruch sympathischer Vasokonstriktion führt. Der OCT3, welcher auch als EMT bezeichnet wird, transportiert Monoamine und Katecholamine aus dem Extrazellularraum in die Zelle. Horvath et al. [37] zeigten, dass nach Blockade des OCT3 durch Corticosteron die extrazelluläre Norepinephrinkonzentration ansteigt und infolge dessen eine Vasokonstriktion durch eine verlängerte Aktivierung von  $\alpha 1$ -Adrenorezeptoren entsteht.

## **2.7 Involvierung der organischen Kationentransporter in das non-neuronale cholinerge System**

Im Jahr 2001 zeigte die Arbeitsgruppe um Wessler et al. [10] durch Untersuchungen an menschlichen Plazentarzotten, dass OCT vermutlich die Freisetzung von non-neuronalem ACh vermitteln. ACh spielt vor allem als Neurotransmitter im zentralen und peripheren Nervensystem eine Rolle, ist jedoch auch in die Regulation basaler non-neuronaler Zellfunktionen involviert. In vielen non-neuronalen Zellen, wie Epithel-, Endothel-, Mesothel- und Immunzellen sowie glatten Muskelfasern, kommen ACh und das ACh synthetisierende Enzym Cholin-Acetyltransferase (ChAT) vor [5, 7]. Non-neuronales ACh reguliert im Atemwegs-, Haut- und Magen-Darm-Trakt-Epithel auto- und parakrin die Proliferation, Differenzierung und den Erhalt von Zell-zu-Zell-Kontakten [5, 6, 53, 54]. Zudem steigert non-neuronales ACh die Proliferationsrate von Bronchialepithelzellen und erhöht nach Wong et al. [55] in der Bronchialmukosa die ziliäre Schlagfrequenz mittels muskarinischer Rezeptoren [5].

Über die Mechanismen, mit denen non-neuronale Zellen ACh in den Extrazellularraum freisetzen, war bislang noch wenig bekannt. Sowohl in parasympathischen Nervenendigungen als auch in non-neuronalen Zellen erfolgt die ACh-Synthese aus Acetyl-CoA und Cholin durch das ACh-Syntheseezym ChAT. In Nervenendigungen transportiert der vesikuläre Acetylcholin-Transporter (VAChT) das ACh in synaptische Vesikel. Nach dessen Freisetzung in den synaptischen Spalt erfolgt durch die Cholin-Esterase

die Spaltung in Acetat und Cholin. Das entstandene Cholin wird mittels eines hochaffinen Cholin-Transporters (CHT1) wieder in die synaptische Nervenendigung aufgenommen [56, 57]. Während bei Nervenendigungen der Freisetzungsmechanismus des ACh über synaptische Vesikel und Exozytose bekannt ist, ist der Weg des ACh aus den non-neuronalen Zellen wenig erforscht. Früheren Studien von Wessler et al. [6, 53] zufolge enthalten Epithelzellen sowohl non-neuronalen ACh als auch das Syntheseeenzym ChAT sowie nikotinische und muskarinische ACh-Rezeptoren [5]. Zudem exprimieren sie den hoch-affinen Cholintransporter CHT1 [56]. Ein Beweis für die Speicherung von ACh in Vesikeln und dessen Freisetzung mittels Exozytose aus non-neuronalen Zellen konnte bisher nicht erbracht werden [6], jedoch zeigte die Arbeitsgruppe um Wessler et al. [10], dass OCT hier eine Rolle bei der ACh Freisetzung aus der Plazenta und anderen non-neuronalen Geweben spielen. Da ACh als organisches Kation ein potenzielles Substrat für OCT darstellt und diese in unterschiedlichen Zelltypen inklusive Plazenta vorhanden sind, untersuchten Wessler et al. [10], ob OCT non-neuronalen ACh transportieren. Zur Beantwortung dieser Fragestellung stellte die Plazenta ein geeignetes Modell dar, da sie weder durch extrinsische noch intrinsische cholinerge Neuronen innerviert wird. Messungen an menschlichen Plazentarzotten in An- und Abwesenheit von Substanzen, die bekanntermaßen mit OCT interferieren, zeigten eine kontinuierliche ACh-Freisetzung, die in Anwesenheit der OCT-Inhibitoren Quinin, Noradrenalin oder Corticosteron gehemmt wurde. Ebenso bewirkten die organischen Kationen Amilorid, Cimetidin und Verapamil, die Substratinhibitoren der OCT sind, eine reduzierte ACh-Freisetzung. Der Natriumkanal-Inhibitor Procain dagegen hatte keine Auswirkung. Basierend auf diesen Beobachtungen stellten Wessler et al. [10] die Hypothese einer OCT-vermittelten ACh-Freisetzung aus non-neuronalen Zellen auf. Eine 2005 veröffentlichte Studie von Lips et al. [8] zeigte, dass OCT auch in Atemwegsepithelien exprimiert werden. Immunhistochemische Untersuchungen bei Ratte und Mensch ergaben eine Lokalisation von OCT1 und 2 in der luminalen und von OCT3 in der basolateralen Membran zillientragender Epithelzellen des Tracheal- und Bronchialepithels. Diese sind Schauplatz auto- und parakriner non-neuronaler cholinergischer Regulationen, enthalten aber in Ratten weder Speichervesikel für ACh noch den vesikulären

ACh-Transporter (VAChT) [6, 8, 53, 54]. Dieser wurde lediglich in cholinergen Nervenendigungen gefunden, welche die glatte Muskulatur der Trachea und Bronchi innervieren, und in sekretorischen Zellen, aber nicht in den zilientragenden Epithelzellen der Atemwege [8]. Die von Lips et al. [8] durchgeführten Messungen an OCT-exprimierenden *Xenopus laevis*-Oocyten belegten einen durch OCT1 und OCT2 vermittelten ACh-Transport aus der Zelle, aber nicht durch OCT3 [8]. Resultierend hieraus besteht die Annahme, dass OCT1 und 2 wichtig für die luminale Freisetzung von ACh aus zilientragenden Bronchialzellen sind. Diese Untersuchung bekräftigt die von Wessler et al. [10] aufgestellte Hypothese einer OCT1- und 3-vermittelten ACh-Freisetzung aus non-neuronalen Zellen. Die Arbeitsgruppe um Lips [8] berichtete zudem, dass Glucocorticoide, wie Corticosteron, in die cholinerge Regulation eingreifen, indem sie die hOCT2-abhängige ACh-Freisetzung blockieren.

## **2.8 Neuronale cholinerge Regulation**

Säugetiere besitzen in Atemwegen sowohl ein neuronales als auch ein non-neuronaues cholinerges System, wobei das parasympathische Nervensystem der nervale Hauptmechanismus zur Regulation der Bronchialweite darstellt [4]. Die rasche Abnahme des pulmonalen Widerstands nach Blockade der MR zeigt, dass cholinerge Mechanismen eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Bronchotonus spielen [58, 59]. Transmitter des parasympathischen Nervensystems ist ACh, das an prä- und postsynaptischen Membranen mit MR reagiert. Caulfield und Birdsall et al. [60] identifizierten fünf molekular unterschiedliche MR-Subtypen, MR1, MR2, MR3, MR4 und MR5. In Lungen von Nagern, Schweinen und Menschen werden die MR1-, MR2- und MR3-Subtypen exprimiert [61]. Die Kontraktion der peripheren Atemwege in Mäusen ist nach Struckmann et al. [15] auf die Aktivierung der MR2- und MR3-Subtypen zurückzuführen. Die Arbeitsgruppe um Struckmann et al. [15] untersuchte 2003 am Modell der PCLS von MR1-, MR2-, MR3- und MR2/3-defizienten Mäusen die physiologische Rolle der einzelnen MR-Subtypen 1, 2 und 3 in der

Lungenfunktion. Es zeigte sich hierbei, dass bei MR2/3<sup>-/-</sup>-Tieren im Gegensatz zu den anderen Knockout-Tieren und dem WT nach kumulativer Muskarinapplikation ( $10^{-8}$  –  $10^{-4}$  M) keine Bronchokonstriktion erfolgte [15]. Die cholinerge Kontraktion der peripheren Atemwege von Nagern wird demzufolge durch die MR-Subtypen 2 und 3 zusammen vermittelt.

## **2.9 Interaktion der organischen Kationentransporter mit Serotonin**

Das Monoamin 5-HT, das aus der essenziellen Aminosäure Tryptophan synthetisiert wird, ist ubiquitär im tierischen Organismus nachzuweisen. Zu 90 % findet es sich in enterochromaffinen Zellen, aus welchen es über das Serum beim Mensch in Thrombozyten und beim Nager in Mastzellen gelangt [69]. Eine Rolle als Mediator im ZNS spielt 5-HT v.a. bei Mäusen, Ratten und Kaninchen. 5-HT besitzt eine Vielzahl von Rezeptoren, was die verschiedenen und z.T. auch entgegensätzlichen Wirkungen im Organismus erklärt. Bislang sind 7 verschiedene 5-HT-Rezeptoren bekannt: 5-HT<sub>1-7</sub>, welche nochmals in Subtypen unterteilt werden [69]. Diese sind bis auf den ionotropen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor alle G-Protein-gekoppelt. Die bei Nagern und auch an Asthma erkrankten Menschen beobachtete 5-HT-induzierte Bronchokonstriktion ist auf eine Aktivierung des 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptors zurückzuführen. Der Veröffentlichung von Moffatt et al. [3] zufolge bewirkt 5-HT in der Trachea der Maus eine ACh-Freisetzung aus einer non-neuronalen Quelle. In Mäusen und vielen anderen Säugetieren führt 5-HT zu einer Bronchokonstriktion, die mit dem Muskarinantagonisten Atropin gehemmt werden kann [1]. Die am Modell der Mäusetrachea durchgeführte Studie von Moffatt et al. [3] zeigte eine dosisabhängige Hemmung der 5-HT-induzierten Kontraktion der Trachea mit Atropin. Ebenso erfolgte bei zerstörtem Atemwegsepithel eine reduzierte Kontraktion, wohingegen Neurotoxine die 5-HT-induzierten Kontraktion nicht beeinflussten [3]. Basierend hierauf stellte die Arbeitsgruppe um Moffatt et al. [3] die Hypothese auf, dass Stimulation des epithelialen 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptors eine ACh-Freisetzung aus dem Atemwegsepithel induziert, welche zur cholinergen Kontraktion der Trachea führt. Bereits in früheren Veröffentlichungen von Eum

et al. [1] und Levitt et al. [2] wurde auf Grund der Inhibition der 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion durch Muskarinrezeptorantagonisten wie Atropin auf eine Beteiligung von ACh an der 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion geschlossen. Des Weiteren berichtete die Arbeitsgruppe um Schmitt et al. [11], dass die OCT 5-HT transportieren. 5-HT-Transporter (5-HTT)-defiziente Mäuse wiesen im Hippocampus eine verstärkte Expression des OCT3 auf, während die 5-HT-Konzentration unverändert blieb. Die Aufnahme von 5-HT war durch 5-HTT-selektive Inhibitoren nicht beeinflussbar. Resultierend hieraus erfolgte bei 5-HTT-ko-Tieren eine Kompensation und somit 5-HT-Aufnahme über OCT3 [11]. Nach Chen et al. [12] vermitteln OCT1 und OCT3, die auch in serotonergen Neuronen submucosaler und myenterischer Plexus in Mäusen auftreten, die Wiederaufnahme von 5-HT, welches aus enterochromaffinen Zellen freigesetzt wurde. Eine Deletion des hochaffinen  $\text{Na}^+$ /5-HT-Kotransporters (SERT) führte zu einer Kompensation durch OCT1 und den  $\text{Na}^+$ -abhängigen Dopamin-Transporter (DAT) [12].

## **2.10 Ziel der Arbeit**

5-HT bewirkt in Mäusen eine Bronchokonstriktion [62]. Moffatt et al. [3] stellten durch Untersuchungen an der Trachea von Mäusen die Hypothese auf, dass 5-HT die Freisetzung von non-neuronalem ACh aus dem Trachealepithel induziert und somit zur Kontraktion führt. Eine frühere Studie am Modell humaner Plazentazotten berichtete über eine Freisetzung von non-neuronalem ACh durch die OCT-Subtypen OCT1 und OCT3, die mit den OCT-Inhibitoren Quinin und Corticosteron gehemmt werden konnte [10]. Lips et al. [8] zeigten kürzlich, dass OCT1, OCT2 und OCT3 in den meisten respiratorischen Epithelzelltypen von Nagern exprimiert sind und dass die Subtypen OCT1 und OCT2 im Gegensatz zu OCT3 in vitro ACh transportieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine mögliche Rolle der OCT-Subtypen OCT1, OCT2 und OCT3 bei der 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion zu identifizieren, basierend auf der Hypothese, dass 5-HT mittels der OCT-Subtypen eine ACh-Freisetzung aus dem respiratorischen Epithel bewirkt. Zur Klärung dieser Hypothese erfolgten



Untersuchungen an vitalen Lungenschnittpräparationen von OCT<sup>-/-</sup>- und den korrespondierenden WT-Mäusen (Mäusestamm FVB) und zur Identifikation der cholinergen Komponente bei der 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion wurde zudem eine Versuchsreihe mit PCLS von MR2/3<sup>-/-</sup>-Mäusen und dem entsprechenden WT-Mäusestamm durchgeführt.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Pharmaka

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht der verwendeten Substanzen, deren Hersteller, Lösungsmittel, Lagerung, eingesetzte Endkonzentrationen, aliquotierte Einheiten und Mengen wieder.

Pharmakon	Hersteller	Lösungs- mittel	Verdünnung [M]	Aliquot s [µl]	Lager- temperatur [°C]
<b>Atropin- sulfat</b>	RBI	Aqua ad injectabilia	10 <sup>-4</sup>	50	-20
<b>Cortico- steron</b>	Sigma-Aldrich Chemie	EtOH absolut	10 <sup>-6</sup>	50	-20
<b>Muskarin- Chlorid</b>	Sigma-Aldrich Chemie	Aqua ad injectabilia	10 <sup>-6</sup>	80	-20
<b>Quinin</b>	Sigma-Aldrich Chemie	Aqua ad injectabilia	10 <sup>-4</sup>	50	-20
<b>5-HT</b>	Sigma-Aldrich Chemie	Aqua ad injectabilia	10 <sup>-6</sup>	80	4
<b>U-46619</b>	Sigma-Aldrich Chemie	EtOH absolut	10 <sup>-5</sup>	50	-20

**Tabelle 1: Übersicht Pharmaka**

### 3.1.2 Lösungen

#### HEPES-Ringer-Puffer

Zur Herstellung von HEPES-Ringer-Puffer wurden folgende Bestandteile in 5 l destilliertem Wasser unter ständigem Rühren gelöst:

Kaliumchlorid (Fa. Merck, Darmstadt)	2,09 g
Natriumchlorid (Fa. Roth)	39,85 g
Glucose (Fa. Sigma-Aldrich Chemie)	9,90 g
Hepes (Fa. Sigma-Aldrich Chemie)	11,90 g

Hierzu wurden 5 ml einer 1-molaren Magnesiumchlorid- ( $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) und 11 ml einer 1-molaren Calciumchlorid-Lösung ( $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) hinzugefügt. Zur Einstellung eines pH von 7,4 erfolgte die Zugabe von 23 ml 1-molarer Natronlauge (1 M NaOH, Fa. Merck). Anschließend wurde der Puffer steril filtriert und bei 4 °C aufbewahrt.

#### Agarose

Zur Herstellung einer 1,6%igen Agarose wurden unmittelbar vor Präparation der Maus 0,16 g Trockensubstanz (Low Melt Preparative Grade Agarose, Fa. BIO-RAD, München) mit 10 ml HEPES-Ringer-Puffer (pH 7,4) mehrmals aufgekocht und anschließend, um ein Festwerden zu verhindern, im Inkubator bei 37 °C gelagert

#### Nitroprussid-Natrium

$2,637 \times 10^{-2}$  g Trockensubstanz Nitroprussid-Natrium (Nipruss<sup>®</sup>, Fa. Schwarz-Pharma, Zwickau) wurden in 10 ml Aqua ad injectabilia gelöst. Hiervon wurden Aliquots von 150 µl bei -20 °C aufbewahrt.

#### Aqua ad injectabilia

Als Lösungsmittel wurde Wasser für Injektionszwecke (Ampuwa<sup>®</sup>, Fa. B. Braun, Melsungen) verwendet.

### Spüllösung

Zum Spülen der Lungengefäße erfolgte die Zubereitung einer Lösung direkt vor der Präparation mit folgender Zusammensetzung: 20 ml HEPES-Ringer-Puffer (pH 7,4), 200 µl Natrium-Heparin (Liquemin<sup>®</sup>, Fa. Hoffmann- La Roche, Grenzach-Weylen, 25000 I.E./ml), 100 µl Penicillin (10000 U/l)-Streptomycin (10 mg/ml)-Lösung (PAA Laboratories, Linz, Österreich). Unmittelbar vor Einsatz der Spüllösung wurden noch 149 µl Nitroprussid-Natrium zugesetzt.

### Medium

Die Inkubation der Lungenschnitte erfolgte in 100 ml EARLE's Minimal Essential Medium (MEM, Fa. PAA Laboratories), welchem 1 ml der zuvor erwähnten Penicillin-Streptomycin-Lösung zugesetzt wurden.

### **3.1.3 Tiere**

Die Studie erfolgte an 2 OCT<sup>-/-</sup>-Mäusestämmen, OCT1/2<sup>-/-</sup> und OCT3<sup>-/-</sup>, und dem korrespondierendem WT-Mäusestamm (FVB) (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam) mit folgendem genetischem Hintergrund: OCT1/2<sup>-/-</sup> (50 % 129/OLA, 50 % FVB) [35], OCT3<sup>-/-</sup> (25 % 129/OLA, 75 % FVB/N) [40], und an dem MR-defizienten Mäusestamm M2/3<sup>-/-</sup> mit dem korrespondierenden WT-Mäusestamm M2/3<sup>+/+</sup> mit dem genetischen Hintergrund [129/J1 (25 %) x 129SvEv (25 %) x CF1 (50 %)] [15]. Die für die Versuchsreihen verwendeten Mäuse waren unterschiedlichen Geschlechts und zwischen 35 und 185 Tagen alt. Die Unterbringung der OCT<sup>-/-</sup>- und FVB-Tiere erfolgte unter Standardbedingungen in Makrolonkäfigen im Tierstall des Institutes für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, während die M2/3<sup>-/-</sup>- und M2/3<sup>+/+</sup>-Tiere in der spezifiziert pathogen-freien (SPF) Anlage der Justus-Liebig-Universität Gießen in Makrolonkäfigen untergebracht waren. Das Gewicht der Mäuse betrug zwischen 20 g und 40 g.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Präparation der Mäuselunge**

Die Maus wurde mit Hilfe einer Pinzette durch Genickbruch getötet. Anschließend wurde sie gewogen und für die Präparation in Rückenlage fixiert. Das Präparierbesteck bestand aus einer kleinen anatomischen Pinzette und einer feinen Schere. Alle für die Präparation notwendigen Instrumente wurden mittels UV-Bestrahlung sterilisiert.

Nach dem Hautschnitt, der in der Medianen von der Leiste bis zum Kinn reichte, und Eröffnen der Bauchhöhle, erfolgte mittels Durchtrennung der Aorta abdominalis das Ausbluten. Anschließend wurden Herz, Lunge und Trachea durch beidseitiges Durchtrennen der Rippen und des Schultergürtels ohne Verletzung der Lungenflügel freigelegt und um die Trachea locker ein Ligaturfaden geschlungen. Die Durchführung der Lungengefäßspülung erfolgte mit Hilfe einer Pumpe (Fa. Gilson®, Abimed, Minipuls 2) und einem daran angeschlossenen Schlauchsystem, an dessen eines Schlauchende eine Kanüle befestigt wurde. Die Spülflüssigkeit (ca. 20 ml) gelangte hierbei über die in den rechten Vorhof eingeführte Kanüle in den Herz-Lungen-Kreislauf und floss durch einen zuvor gemachten Schnitt im linken Ventrikel wieder ab. Anschließend wurde die Trachea im oberen Drittel oberhalb der lockeren Ligatur quer inzidiert. Mit Hilfe eines auf eine 2 ml-Spritze aufgesetzten Venenverweilkatheters der Größe 1,2 x 33 mm (Vasocan® Braunüle®, Fa. B. Braun, Melsungen) wurde die noch flüssige Agarose über das Loch in der Luftröhre in die Lunge eingebracht. Nachdem die Lunge durch das Einfüllen von ca. 2 ml Agarose voll entfaltet war, wurde ein Zurückfließen dieser durch Anziehen der Ligatur verhindert. Abschließend erfolgte das Herauslösen von Herz, Lunge und Trachea im Zusammenhang und sofortiges Einbringen in ein mit gekühltem HEPES-Ringer-Puffer gefülltes Becherglas, was ein Festwerden der Agarose zur Folge hat.

### **3.2.2 Anfertigen der Lungenpräzisionsschnitte**

Zum Schneiden der Lunge diente ein Vibratom (Vibrating Blade Tissue Slicer, VT 1000S, Fa. Leica, Wetzlar).

Vorbereitend wurde noch vor der Präparation der Maus die Kühlung des Vibratoms angestellt und die in das Vibratom installierte Pufferwanne randvoll mit HEPES-Ringer-Puffer gefüllt, um somit eine spätere Schneidetemperatur von 4°C zu erreichen. Zusätzlich wurde eine ca. 1,5 cm hohe Korkenhälfte auf den mobilen Teil des Schneidetellers mit Sekundenkleber (Fa. UHU GmbH, Bühl) geklebt und in den Messerhalter des Vibratoms eine halbierte Rasierklinge festgeschraubt.

Zum Anfertigen der PCLS wurde ein jeweils einzeln präparierter Lungenflügel an die Margo dorsalis mit Sekundenkleber auf dem Schneidetisch befestigt, wobei die Facies diaphragmatica an der dem Schneideteller aufklebenden Korkenkopfhälfte lehnte und die Margo acutus nach oben zeigte.

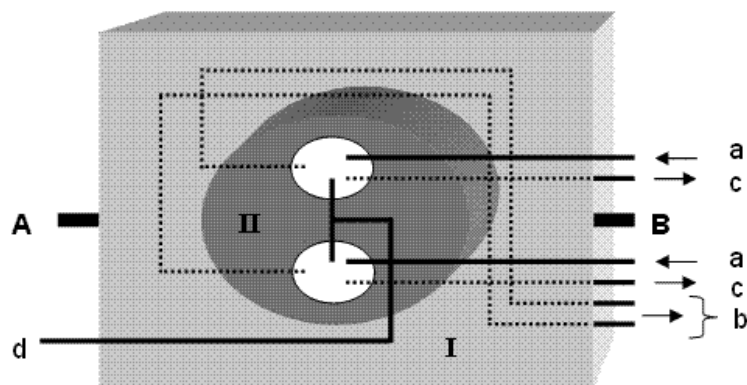
Nach Fixation des Probenhalters in der Pufferwanne und Einstellen der Parameter im Bedienfeld des Vibratoms (Schnittbreite: 200 µm, Geschwindigkeit: 0,5 mm/s, Frequenz: 100 Hz) erfolgte das Anfertigen der vitalen Schnittpräparationen eines Lungenflügels.

Anschließend wurden die in der Schneidewanne schwimmenden Schnitte mittels einer Pinzette in ein mit 100 ml MEM (1 % Penicillin/Streptomycin) gefülltes Becherglas überführt und es erfolgte für mindestens 2 Stunden eine kontinuierliche Begasung der Lungenschnitte mit einem Normoxiegasgemisch, bestehend aus 73,7 % Stickstoff, 21 % Sauerstoff und 5,3 % Kohlendioxid, im Wärmeschrank bei einer Temperatur von 37 °C.

### 3.2.3 Videomorphometrie

#### Versuchsaufbau Videomorphometrie

Für die Videomorphometrie wurde auf dem Objekttisch eines inversen Mikroskops (Fa. Leica) eine spezielle Inkubationskammer für Lungen-Präzisionsschnitte (Fa. Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten) installiert, welche im Zentrum 2 Inkubationszellen von jeweils ca. 1,5 cm Durchmesser enthielt. Beim Versuchsablauf war jedoch stets nur eine der Zellen in Gebrauch.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Inkubationskammer (I) mit 2 Inkubationszellen im Zentrum (II), Zu- (A) und Ablauf (B) für das Wasserbad, Zu- (a) und Abfluss (b) der Inkubationszellen, manueller Abfluss (c) der Inkubationszellen, Gaszufuhr (d)

Die Zellen der Inkubationskammer waren durch ein Schlauchsystem an eine Pumpe (Fa. Gilson®, Miniplus 3, Abimed) angeschlossen, wodurch ein kontinuierlicher Zu- und Abfluss von Flüssigkeit möglich war. Hieraus ergab sich eine konstante Flüssigkeitsmenge von 2 ml in der Zelle. Durch Beheizen der Inkubationskammer mit Hilfe eines Wasserbades konnte eine konstante Temperatur von 37°C aufrecht gehalten werden.

Als Durchflussmedium für die Zelle und folglich auch für den Lungenschnitt wurde HEPES-Ringer-Puffer (pH 7,4, 37°C) verwendet. Für einen Versuch wurde jeweils ein Lungenschnitt in die Zelle eingelegt und mit Hilfe eines

passgenauen Metallgitters fixiert. Anschließend wurde der Schnitt bei 10facher Vergrößerung nach einem geeigneten Bronchus durchmustert.

Hierbei galten folgende Auswahlkriterien:

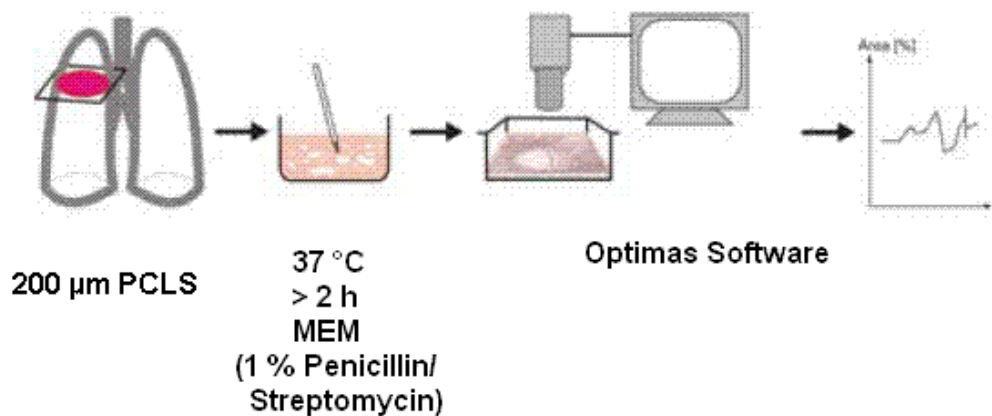
<b>1. Anschnitt:</b>	quer
<b>2. Größe:</b>	ca. 200 µm Durchmesser
<b>3. Integrität:</b>	Epithel + Tunica muscularis unversehrt
<b>4. Lumen:</b>	frei von Fremdkörpern (Blut, Agarose,...)
<b>5. Vitalität:</b>	Kontraktion nach Muskarinzugabe

**Tabelle 2: Qualitätskriterien der verwendeten Lungenschnitte**

Eine an das Mikroskop angeschlossene Digitalkamera (Fa. Stemmer, Puchheim) ermöglichte zur Bildanalyse eine Bildübertragung auf den Computer, der mit der Software Optimas 6.5 (Fa. Stemmer) ausgestattet war. Auf diese Weise konnte der im Mikroskop ausgewählte Bronchus als Bildausschnitt auf dem Monitor wiedergegeben werden, wobei während eines Versuches alle 60 Sekunden das aktuelle Bild gespeichert wurde.

Die Zugabe der verschiedenen Substanzen erfolgte unter Zuhilfenahme einer Pipette direkt in die Inkubationszelle, wobei durch Ab- bzw. Anstellen der Pumpe auf Höchstgeschwindigkeit (Einstellung „rapid“) für ca. 10 Minuten ein Verbleiben oder Entfernen der zugesetzten Substanz erzielt wurde.

Aufgrund dessen war es während eines Versuches möglich, bei reversiblen Vorgängen wieder annähernd den Ausgangszustand des Bronchus zu erreichen und somit unterschiedliche Substanzen zu testen.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Videomorphometriearbeitsschritte**

### Versuchsablauf

Nach Einstellung eines geeigneten Bronchus auf dem Bildschirm erfolgte für ca. 3-4 Minuten eine kurze Adaptionsphase, in der der Lungenschnitt gespült (Stufe 4) wurde. Als Spülmedium diente hierbei HEPES-Ringer-Puffer. Anschließend an diese kurze Adaptionszeit wurde durch Speicherung des ersten Bildes der Versuch gestartet. Der Versuchsablauf im Einzelnen ist in Tabellen 3 und 4 wiedergegeben. Die durch Bildspeicherung im Minutentakt entstandene Bildersequenz eines Versuches wurde im weiteren Verlauf ausgewertet.

Die Durchführung der drei Versuchsreihen mit den unterschiedlichen Inhibitoren Atropin, Quinin und Corticosteron erfolgte an zwei OCT-Knockout-Mäusestämmen - OCT1/2-Doppelknockout (OCT1/2<sup>-/-</sup>) und OCT3-Knockout (OCT3<sup>-/-</sup>) - und dem zu beiden OCT<sup>-/-</sup>-Stämmen korrespondierendem WT-Stamm FVB (Tabelle 3). Zur näheren Identifikation der cholinergen Komponente wurde zusätzlich eine Versuchsreihe mit PCLS des MR-defizienten Mäusestamms MR2/3-Doppelknockout (M2/3<sup>-/-</sup>) und dem korrespondierendem WT-Stamm MR2/3<sup>+/+</sup> durchgeführt, in der neben 5-HT und Muskarin das Thromboxan-Analog U-46619 als konstriktorischer Teststimulus eingesetzt wurde (Tabelle 4).



<b>Bildnummer</b>	<b>Sequenzdauer [Minuten]</b>	<b>Versuchsablauf OCT<sup>-/-</sup>-Tiere</b>
1. - 5.	5	ohne Substanz
6. - 10.	5	Muskarin 10 <sup>-6</sup> M
11. - 25.	15	Spülung rapid
26. - 40.	15	5-HT 10 <sup>-6</sup> M
41. - 55.	15	Spülung rapid
56. - 60.	5	Inhibitor (Atropin 10 <sup>-4</sup> M/Quinin 10 <sup>-4</sup> M/Corticosteron 10 <sup>-6</sup> M)
61. - 75.	15	Inhibitor + 5-HT 10 <sup>-6</sup> M
76. - 90.	15	Spülung rapid

**Tabelle 3: Versuchsprotokoll OCT<sup>-/-</sup>-Tiere**

<b>Bildnummer</b>	<b>Sequenzdauer [Minuten]</b>	<b>Versuchsablauf MR2/3<sup>-/-</sup>-Tiere</b>
1. - 5.	5	ohne Substanz
6. - 10.	5	Muskarin 10 <sup>-6</sup> M
11. - 25.	15	Spülung rapid
26. - 40.	15	5-HT 10 <sup>-6</sup> M
41. - 55.	15	Spülung rapid
56. - 70.	15	U-46619 10 <sup>-5</sup> M

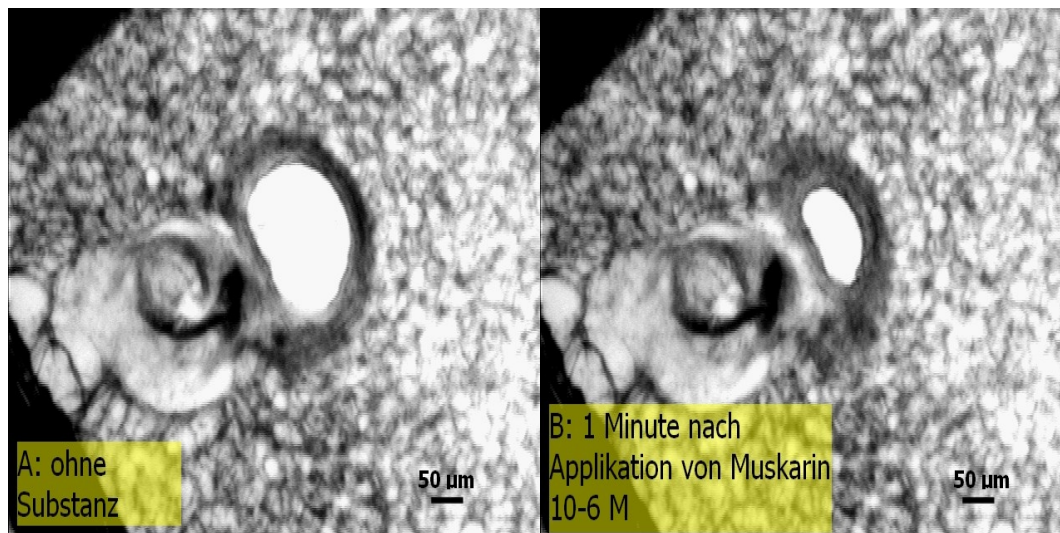
**Tabelle 4: Versuchsprotokoll MR2/3<sup>-/-</sup>-Tiere**

### 3.2.4 Auswertung

#### Auswertung der Bildsequenzen

Nach Abschluss der Messungen diente zur Auswertung der während eines Versuches aufgenommenen Bilder das Analyseprogramm Stemmer Imaging. Hierbei erfolgte zunächst die Kalibrierung der Bildmaße des Computerbildes auf

die Originalgrößenverhältnisse im Mikroskop. Anschließend konnte die luminale Fläche der Bronchi bestimmt werden. Die auf diese Weise entstandenen Ergebnisse wurden zur weiteren Bearbeitung direkt in Excel-Tabellen übertragen.



**Abbildung 7: PCLS mit Bronchus vor (A) und 1 Minute nach Muskarinapplikation (B)**

### **3.2.5 Statistik**

Die Darstellung der Daten erfolgt in Form von Mittelwerten  $\pm$  der Standardabweichung (S.D.), die von 4–8 PCLS von wiederum 4–8 Tieren stammten. Da für die gemessenen Größen keine Normalverteilung angenommen werden kann, wurden nicht-parametrische Tests (SPSS software, SPSS Inc., Chicago, IL) eingesetzt. Für verbundene Stichproben (5-HT  $\leftrightarrow$  Muskarin, 5-HT  $\leftrightarrow$  5-HT/Inhibitor) innerhalb eines Mäusestamms wurde der Wilcoxon-Test verwandt. Für unverbundene Paare zwischen den verschiedenen Mäusestämmen wurde zunächst der Kruskal-Wallis Test und anschließend der Mann-Whitney U Test eingesetzt. Ergab der Kruskal-Wallis Test bei mehr als zwei unverbundenen Proben einen statistisch signifikanten Unterschied, erfolgte der Einsatz des Mann-Whitney U-Test, um zwei unverbundene Paare zu vergleichen. Unterschiede wurden mit  $p < 0.05$  als signifikant betrachtet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Versuchsreihen mit PCLS von OCT1/2<sup>-/-</sup>, OCT3<sup>-/-</sup> und korrespondierenden WT-Mäusen (FVB)

#### 4.1.1 Muskarin- ( $10^{-6}$ M) und 5-HT- ( $10^{-6}$ M) induzierte Bronchokonstriktion

##### FVB

Die ersten 55 Minuten eines Versuches gestalteten sich bei den drei Versuchsreihen gleich. Es erfolgte zunächst eine 5-minütige Adaptationsphase, in deren Anschluss Muskarin  $10^{-6}$  M als Teststimulus für 5 Minuten zugegeben wurde. Nach Ablauf der darauf folgenden Spülung, erfolgte die Applikation von 5-HT  $10^{-6}$  M mit einer sich wiederum anschließenden Spülphase (Vergleich Tabelle 3: Versuchsprotokoll). Die Gesamtzahl der Versuche von FVB-Mäusen belief sich auf 17.

Die luminale Fläche der Atemwege zu Beginn eines Experimentes wurde als 100 % gesetzt, Bronchokonstriktion und -dilatation als prozentuale Ab- bzw. Zunahme dieser Fläche ausgedrückt.

In Lungenschnitten von WT-Mäusen führte die Anwesenheit von Muskarin ( $10^{-6}$  M) zu einer Kontraktion der Bronchi, wobei die gemessene minimale luminale Restfläche innerhalb der 5 Minuten nach Applikation von Muskarin (1  $\mu$ M)  $39 \pm 17$  % im Mittel ergab. Der Anfangsdurchmesser der Bronchi betrug durchschnittlich  $217 \pm 43$   $\mu$ m. Dieser wurde innerhalb von 15 Minuten infolge Elimination von Muskarin durch Anstellen der Spülfunktion wieder erreicht.

Nach Zugabe von 5-HT ( $10^{-6}$  M) zeigte sich ebenfalls eine Bronchokonstriktion. Die Berechnung der minimalen luminalen Restfläche während 15 Minuten Verweilzeit von 5-HT (1  $\mu$ M) ergab einen Mittelwert von  $36 \pm 16$  %. Die Spülung des Bronchus bewirkte nach 15 Minuten eine Bronchodilatation auf die ursprüngliche Größe. Im Wilcoxon-test zeigte sich mit  $p = 0.244$  kein signifikanter Unterschied zwischen der Muskarin- und 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion.

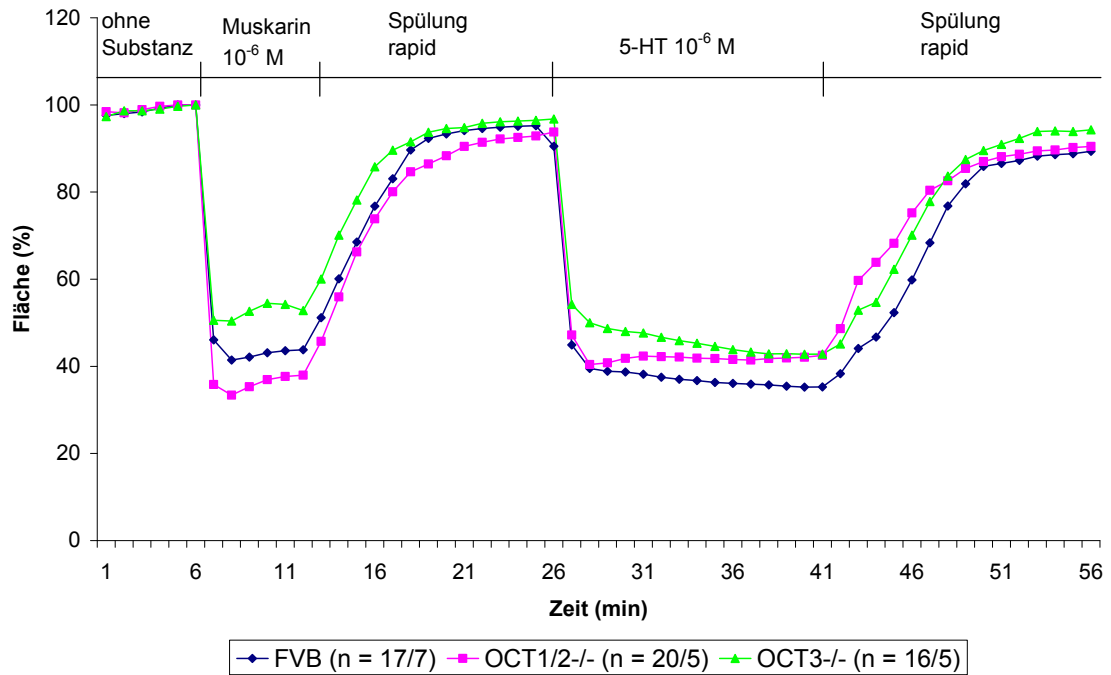
### OCT1/2<sup>-/-</sup>

Die Auswertung der Muskarin- ( $10^{-6}$  M) und 5-HT- ( $10^{-6}$  M) induzierten Bronchokonstriktion bei OCT1/2<sup>-/-</sup>-Tieren erfolgte aus 20 Versuchen. Der durchschnittliche Bronchusdurchmesser betrug zu Versuchsbeginn  $199 \pm 32$   $\mu$ m. Die Auswertung der minimalen luminalen Fläche innerhalb 5 Minuten nach Muskarin-Zugabe ergab eine Bronchokonstriktion von 70 % (luminale Fläche  $31 \pm 10$  %), wohingegen 5-HT zu einer Kontraktion von ca. 60 % führte (luminale Fläche  $37 \pm 12$  % während Verweilzeit). Dies zeigt eine im Verhältnis zueinander um 10 % signifikant stärkere Kontraktion durch Muskarin ( $p = 0.047$ , Wilcoxon-Test). Sowohl die Muskarin- als auch 5-HT-induzierte Bronchokonstriktion waren reversibel, da durch Spülung des Bronchus eine Dilatation auf Ursprungsgröße erfolgte.

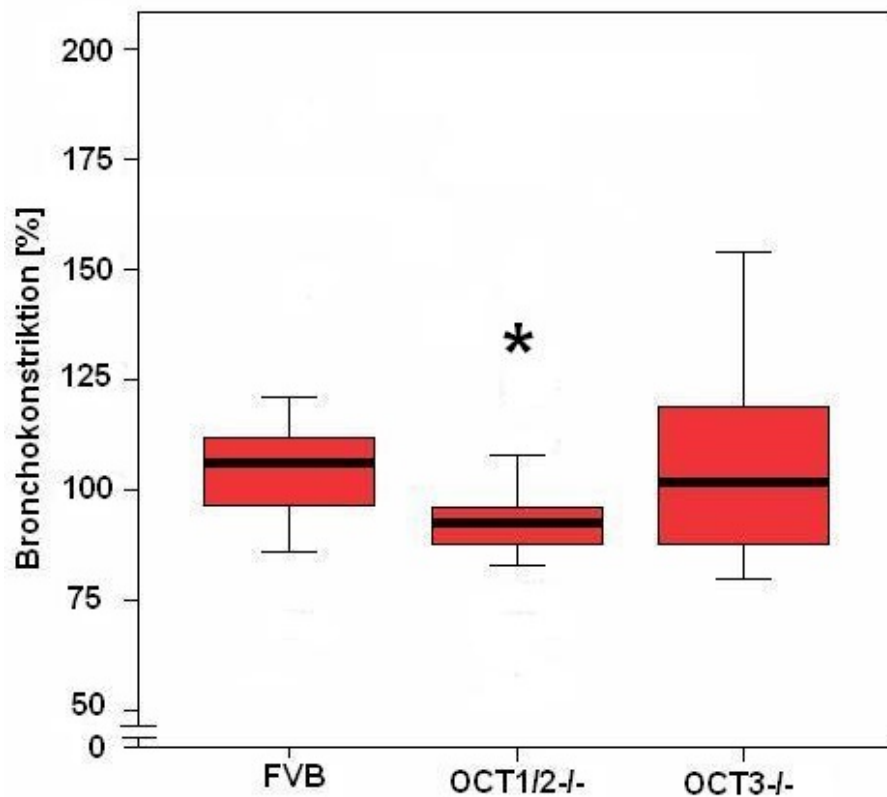
Im Vergleich mit Bronchi der WT-Mäuse wiesen OCT1/2<sup>-/-</sup>-Bronchi eine ebenso schnelle Kontraktion auf Muskarin- bzw. 5-HT-Applikation auf, mit jedoch unterschiedlich starker Reaktion. Es zeigt sich, dass die Kontraktion infolge 5-HT (1  $\mu$ M) sowohl bei PCLS vom WT als auch von OCT1/2<sup>-/-</sup> bei ca. 60 % liegt, jedoch weisen PCLS von OCT1/2<sup>-/-</sup>-Mäusen eine um 10 % stärkere Bronchokonstriktion nach Muskarinapplikation (1  $\mu$ M) auf als PCLS vom WT. Im Mann-Whitney U-Test zeigte sich mit  $p = 0.033$  ein signifikanter Unterschied.

### OCT3<sup>-/-</sup>

In die Auswertung der OCT3<sup>-/-</sup>-Versuchsreihen wurden 16 Versuche miteinbezogen. Der durchschnittliche Anfangsdurchmesser der OCT3<sup>-/-</sup>-Bronchi lag bei  $203 \pm 29$   $\mu$ m (= 100 %). Die Applikation von Muskarin  $10^{-6}$  M führte während der 5 Minuten Einwirkzeit zu einer Abnahme der Bronchusfläche auf minimal  $46 \pm 15$  %. 5-HT  $10^{-6}$  M bewirkte ebenfalls eine Bronchokonstriktion, wobei die luminale Restfläche innerhalb 15 Minuten  $41 \pm 13$  % betrug. Im Wilcoxon-Test zeigte sich mit  $p = 0.602$  bei OCT3<sup>-/-</sup>-Tieren kein signifikanter Unterschied zwischen der 5-HT- und der Muskarin-induzierten Kontraktion.



**Abbildung 8:** Graphische Darstellung der luminalen Bronchusfläche nach Muskarin- (1  $\mu$ M) und 5-HT-Applikation (1  $\mu$ M) bei PCLS von FVB-, OCT1/2<sup>-/-</sup>- und OCT3<sup>-/-</sup>-Tieren. Die Nummern in Klammern entsprechen der Zahl der Bronchi/Zahl der Lungen, aus welchen sie entnommen wurden.



**Abbildung 9:** Die Boxplots illustrieren die innerhalb der Substanzverweilzeit gemessene maximale Stärke der 5-HT-induzierten (1  $\mu$ M) Bronchokonstriktion angegeben als

Prozentzahl der Muskarin-induzierten ( $1\ \mu\text{M}$ ), welche 100 % gesetzt wurde. FVB- und OCT3<sup>-/-</sup>-Bronchi reagieren auf 5-HT nicht signifikant different zu Muskarin, wohingegen OCT1/2<sup>-/-</sup>-Bronchi signifikant stärker auf Muskarin als auf 5-HT reagieren (\* $p < 0.05$ ; Wilcoxon-Test). Die Boxplots zeigen die 0, 25, 50, 75 und 100 Perzentile.

#### 4.1.2 Versuchsreihe mit Atropin ( $10^{-4}\ \text{M}$ )

##### FVB

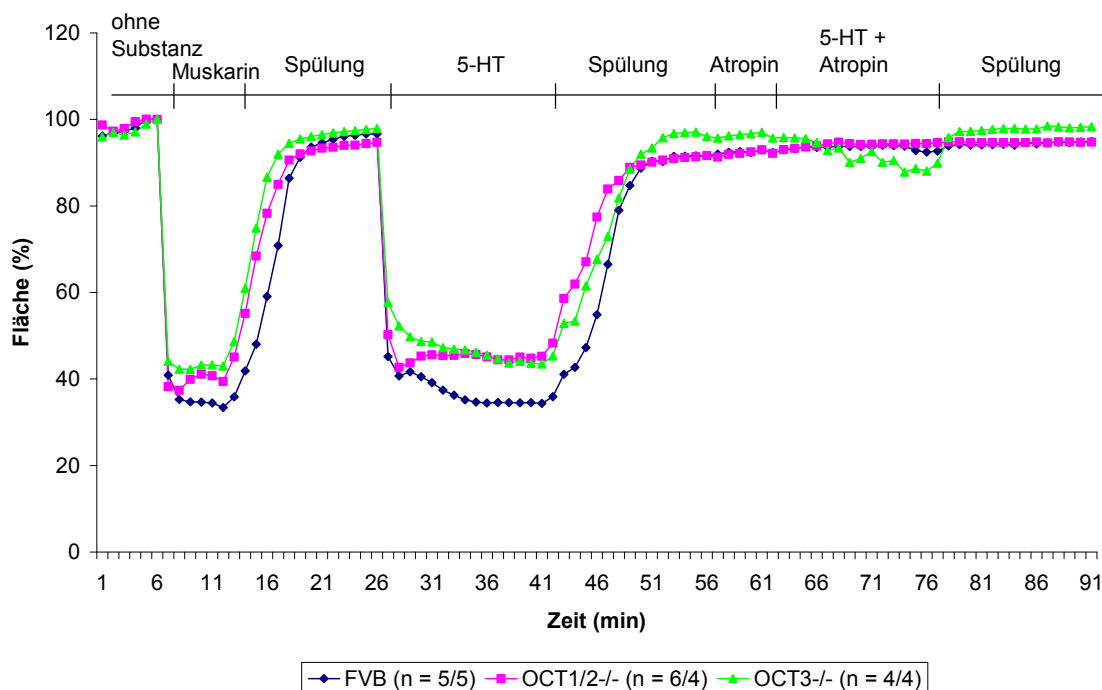
Die Auswertung der Versuchsreihe mit dem Inhibitor Atropin erfolgte aus 5 PCLS von 5 Mäusen mit einem durchschnittlichen Alter von  $75 \pm 19$  Tagen. Der Anfangsdurchmesser der Bronchi betrug  $227 \pm 52\ \mu\text{m}$ . In Anwesenheit von 5-HT ( $1\ \mu\text{M}$ ) lag die maximale Kontraktion im Mittel bei 65 % (luminale Fläche von  $37 \pm 19\ %$  innerhalb 15 Minuten, Abb. 10). Nach Vorinkubation der PCLS mit Atropin  $10^{-4}\ \text{M}$  über 5 Minuten und anschließender Atropin/5-HT-Applikation zeigte sich während 15 Minuten Einwirkzeit eine signifikante Reduktion der 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion um fast 90 % (luminale Restfläche:  $91 \pm 9\ %$ , Abb. 10, Wilcoxon-Test,  $p = 0.043$ ).

##### OCT1/2<sup>-/-</sup>

In OCT1/2<sup>-/-</sup>-Mäusen bewirkte Atropin ( $10^{-4}\ \text{M}$ ) wie bei WT-Tieren eine fast vollständige Hemmung der 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion. Nach Atropin/5-HT-Gabe betrug die minimale luminale Restfläche  $92 \pm 2\ %$  (innerhalb 15 Minuten, Abb. 10), während die 5-HT-Applikation ( $1\ \mu\text{M}$ ) zu einer minimalen Bronchusfläche von durchschnittlich  $40 \pm 16\ %$  (15 Minuten, Abb. 10) führte. Im Wilcoxon-Test zeigte sich mit  $p = 0.027$  ein signifikanter Unterschied zwischen der 5-HT-induzierten und der mittels Atropin inhibierten Kontraktion. Die Auswertung dieser Versuchsreihe erfolgte aus 6 PCLS von 4 Mäusen in einem Alter von  $73 \pm 63$  Tagen und einem Bronchusdurchmesser von  $229 \pm 30\ \mu\text{m}$ . Das Ausmaß der Inhibition der 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion durch Atropin in OCT1/2<sup>-/-</sup>-Mäusen unterscheidet sich nicht signifikant von dem in WT-Mäusen ( $p = 0.792$ , Mann-Whitney U-Test).

### OCT3<sup>-/-</sup>

Für die Versuchsreihe mit dem Inhibitor Atropin ( $10^{-4}$  M) erfolgte die Auswertung von 4 PCLS von 4 OCT3<sup>-/-</sup>-Tieren mit einem durchschnittlichen Anfangsdurchmesser von  $223 \pm 24$   $\mu\text{m}$ . Wie auch bei den WT- und OCT1/2<sup>-/-</sup>-Mäusen beobachtet, führte die Anwesenheit von Atropin zu einer Reduktion der Bronchokonstriktion. 5-HT bewirkte bei OCT3<sup>-/-</sup>-Bronchi eine maximale Kontraktion von ca. 55 % (luminale Restfläche innerhalb 15 Minuten:  $44 \pm 19$  %, Abb. 10), wohingegen sich nach Inkubation mit Atropin während 15 Minuten Einwirkzeit eine maximale Kontraktion von ca. 10 % (luminale Fläche  $88 \pm 10$  %, Abb. 10) beobachten ließ. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Atropin-Versuchsreihe des WT- und OCT1/2<sup>-/-</sup>-Stammes zeigte bei sich OCT3<sup>-/-</sup>-Tieren im Wilcoxon-Test mit  $p = 0.068$  keine Signifikanz zwischen der 5-HT-induzierten und der mit Atropin inhibierten Bronchokonstriktion. Ebenso war zwischen OCT3<sup>-/-</sup>- und WT-Bronchi kein signifikanter Unterschied zwischen der Inhibition der 5-HT-Kontraktion durch Atropin  $10^{-4}$  M festzustellen ( $p = 0.413$ , Mann-Whitney U-Test).



**Abbildung 10:** Graphische Darstellung der Versuchsreihe mit Atropin ( $10^{-4}$  M). Die Abb. zeigt die durchschnittliche luminale Bronchusfläche in [%] in Abhängigkeit von der Zeit bei FVB-, OCT1/2<sup>-/-</sup> und OCT3<sup>-/-</sup>-PCLS. Die Nummern in Klammern entsprechen der Zahl der Bronchi/Zahl der Lungen, aus welchen sie entnommen wurden.

#### 4.1.3 Versuchsreihe mit Corticosteron ( $10^{-6}$ M)

##### FVB

Für die Versuchsreihe mit Corticosteron  $10^{-6}$  M wurden 7 PCLS von 5 WT-Mäusen verwendet, wobei der anfängliche Durchmesser der Bronchi durchschnittlich  $198 \pm 47$   $\mu$ m maß. Die 5-HT-induzierte Bronchokonstriktion betrug maximal ca. 70 % (luminale Fläche  $34 \pm 14$  % während 15 Minuten, Abb. 11). Mittels Corticosteron  $10^{-6}$  M erfolgte eine signifikante Hemmung der 5-HT-induzierten Kontraktion (Bronchusfläche:  $50 \pm 16$  %, Abb. 11,  $p = 0.028$ , Wilcoxon-Test).

##### OCT1/2<sup>-/-</sup>

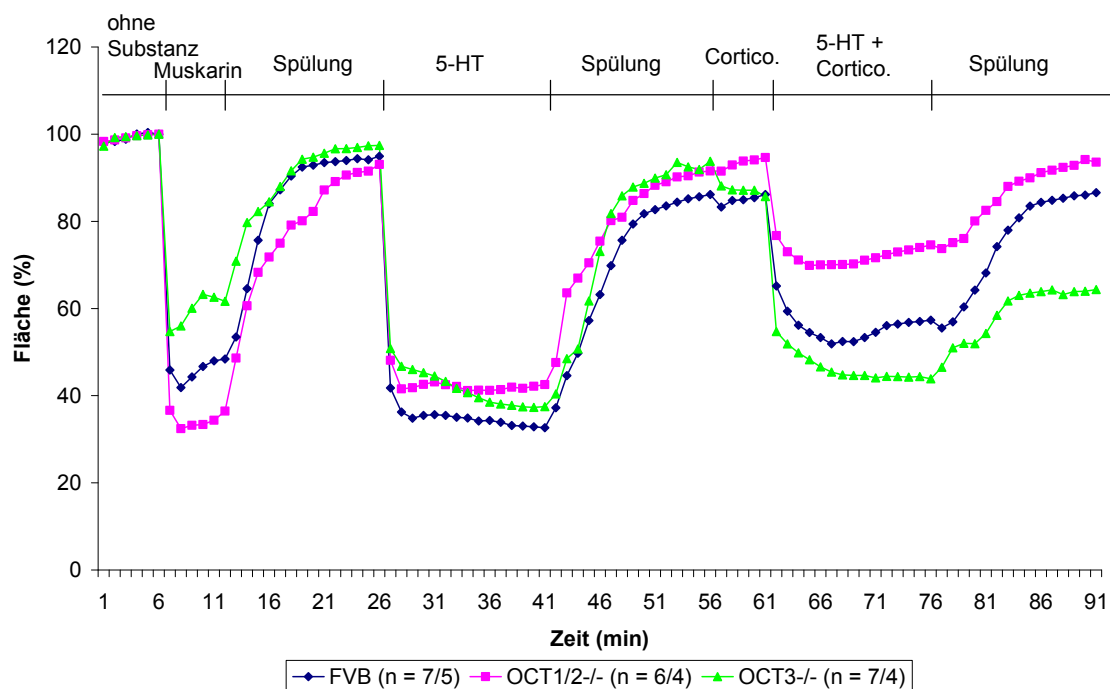
Die Durchführung der Messungen mit dem Inhibitor Corticosteron ( $10^{-6}$  M) erfolgte an 7 PCLS 5 verschiedener OCT1/2<sup>-/-</sup>-Tiere. Wie auch bei PCLS von FVB-Mäusen beobachtet, führte bei OCT1/2<sup>-/-</sup>-Bronchi die Anwesenheit Corticosterons ( $10^{-6}$  M) zu einer Verminderung der 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion. Die im Durchschnitt  $179 \pm 22$   $\mu$ m großen Bronchi wiesen nach 5-HT-Applikation (1  $\mu$ M) innerhalb 15 Minuten eine minimale Restfläche von  $36 \pm 11$  % (Abb. 11) und nach Corticosteron/5-HT-Applikation von  $68 \pm 16$  % (Abb. 11) auf. Bei PCLS von OCT1/2<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigte sich im Wilcoxon-Test mit  $p = 0.043$  ein signifikanter Unterschied zwischen der 5-HT-induzierten und der durch Corticosteron inhibierten 5-HT-induzierten Kontraktion. Das Ausmaß der Inhibition der 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion durch Corticosteron in OCT1/2<sup>-/-</sup>-Tieren unterschied sich nicht signifikant von der in WT-Tieren ( $p = 0.073$ , Mann-Whitney-Test).

##### OCT3<sup>-/-</sup>

Im Gegensatz zu Bronchi der WT- und OCT1/2<sup>-/-</sup>-Mäuse ließ sich bei PCLS von OCT3<sup>-/-</sup>-Tieren keine inhibitorische Wirkung von Corticosteron ( $10^{-6}$  M) auf die 5-HT-bedingte Kontraktion beobachten. Die Messungen erfolgten an 7 PCLS von 4 OCT3<sup>-/-</sup>-Mäusen, welche zu Beginn einen Bronchusdurchmesser von 201



$\pm 34 \mu\text{m}$  aufwiesen. Applikation von 5-HT ( $1 \mu\text{M}$ ) führte während der Einwirkzeit zu einer maximalen Reduktion der Fläche auf  $40 \pm 9 \%$  (Abb. 11), was einer Kontraktion um ca. 60 % entspricht. In Anwesenheit von Corticosteron ( $10^{-6} \text{ M}$ ) betrug die 5-HT-induzierte Bronchokonstriktion ca. 55 % (minimale luminale Restfläche innerhalb 15 Minuten:  $46 \pm 17 \%$ , Abb. 11). Im Wilcoxon-Test zeigte sich bei  $\text{OCT3}^{-/-}$ -Tieren kein signifikanter Unterschied zwischen der Hemmung der 5-HT-induzierten Kontraktion durch Corticosteron und der 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion ( $p = 1.000$ ). Bei PCLS von FVB- und  $\text{OCT1/2}^{-/-}$ -Mäusen ließ sich dagegen ein inhibitorischer Effekt von Corticosteron auf die Bronchokonstriktion feststellen. Die Reaktion von  $\text{OCT3}^{-/-}$ -Bronchi auf Corticosteron ist im Mann-Whitney-Test mit  $p = 0.026$  signifikant verschieden zu FVB-Bronchi, jedoch nicht signifikant zu  $\text{OCT1/2}^{-/-}$ -Bronchi ( $p = 0.07$  [ $\text{OCT1/2}^{-/-}/\text{OCT3}^{-/-}$ ]).



**Abbildung 11:** Graphische Darstellung der Versuchsreihe mit Corticosteron ( $10^{-6} \text{ M}$ ). Die Abb. zeigt die durchschnittliche luminale Bronchusfläche in [%] in Abhängigkeit von der Zeit bei FVB-,  $\text{OCT1/2}^{-/-}$  und  $\text{OCT3}^{-/-}$ -PLCS. Die Nummern in Klammern entsprechen der Zahl der Bronchi/Zahl der Lungen, aus welchen sie entnommen wurden.

#### 4.1.4 Versuchsreihe mit Quinin ( $10^{-4}$ M)

##### FVB

In Anwesenheit des Inhibitors Quinin  $10^{-4}$  M zeigte sich eine im Verhältnis um ca. 70 % signifikant verminderte Kontraktion der Bronchi auf 5-HT  $10^{-6}$  M ( $p = 0.043$ , Wilcoxon-Test). Für diese Versuchsreihe wurden 5 PCLS von 4 Mäusen in die Auswertung miteinbezogen. Der Durchmesser der Bronchi betrug zu Beginn  $233 \pm 16$   $\mu\text{m}$ . Messungen der minimalen luminalen Fläche innerhalb der 15 Minuten nach 5-HT-Applikation (1  $\mu\text{M}$ ) bzw. in Anwesenheit des Inhibitors ergaben folgende Werte (Abb. 12):  $37 \pm 15$  % (5-HT  $10^{-6}$  M) versus  $84 \pm 7$  % (5-HT  $10^{-6}$  M + Quinin  $10^{-4}$  M).

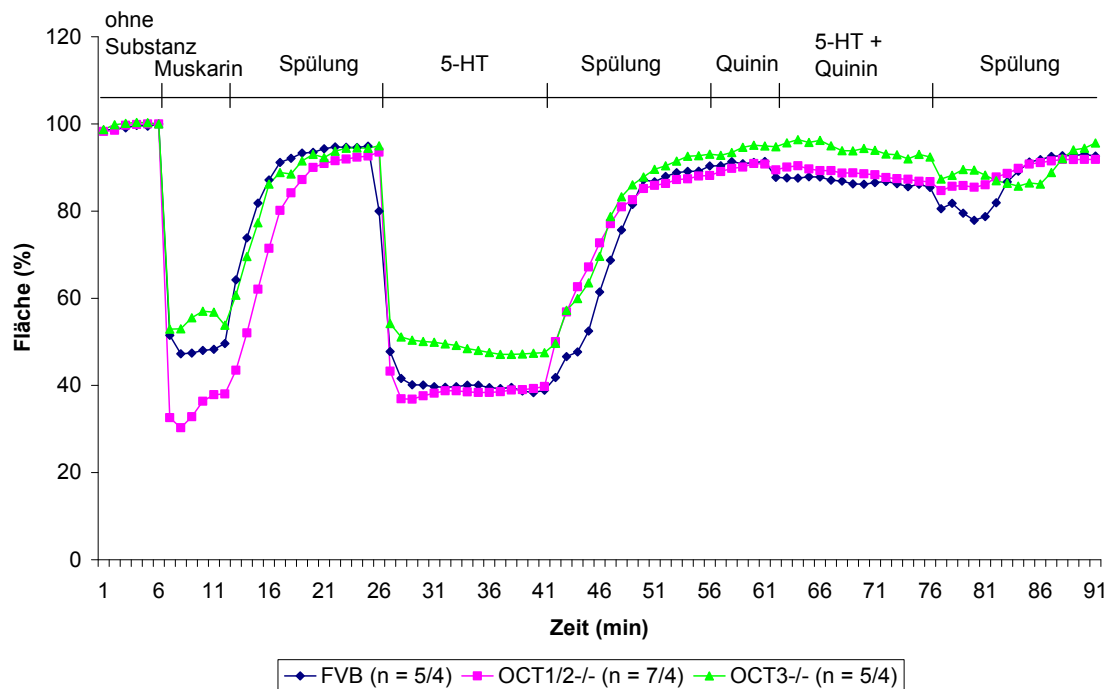
##### OCT1/2<sup>-/-</sup>

In OCT1/2<sup>-/-</sup>-Tieren resultierte die Inkubation der Bronchi mit dem Inhibitor Quinin ( $10^{-4}$  M) wie bei WT-Mäusen in einer Hemmung der 5-HT-induzierten Kontraktion. Die 7 zur Auswertung verwendeten Bronchi von 4 OCT1/2<sup>-/-</sup>-Mäusen mit durchschnittlich  $193 \pm 27$   $\mu\text{m}$  im Durchmesser zeigten infolge 5-HT-Gabe (1  $\mu\text{M}$ ) während 15 Minuten Verweilzeit eine minimale Restfläche von  $35 \pm 9$  % (Abb. 12). Die Anwesenheit des Inhibitors führte zu einer luminalen Bronchifläche von  $86 \pm 5$  % (Abb. 12). Dies ergab eine im Verhältnis um ca. 75 % signifikant reduzierte Bronchokonstriktion ( $p = 0.018$ , Wilcoxon-Test). Die inhibitorische Wirkung von Quinin bei PCLS von OCT1/2<sup>-/-</sup>-Mäusen verglichen mit PCLS von WT-Tieren zeigte keine Signifikanz im Mann-Whitney-Test ( $p = 0.202$ ).

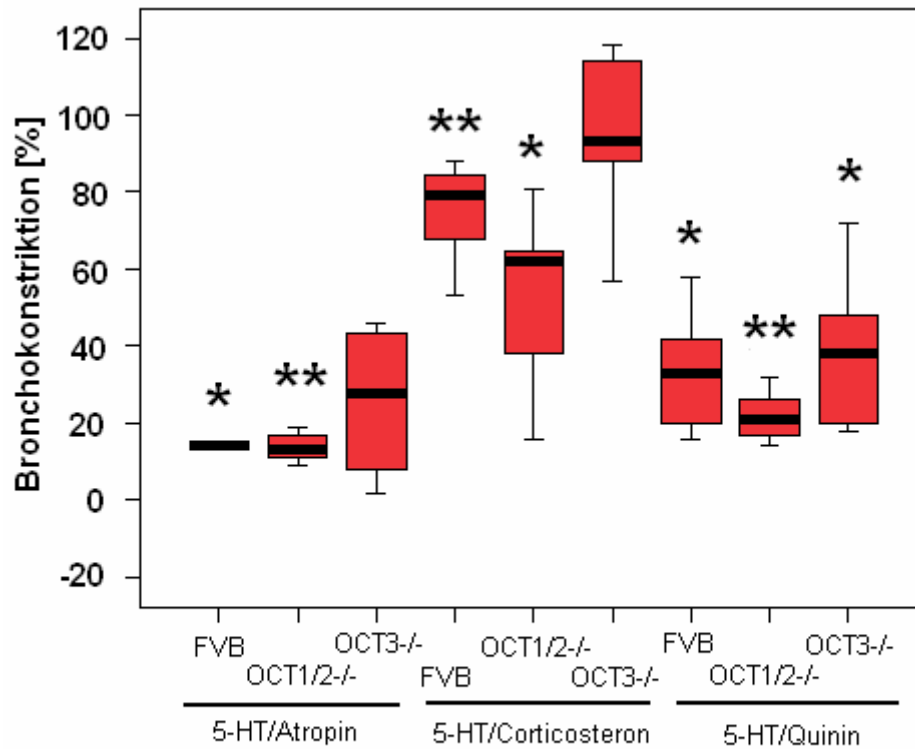
##### OCT3<sup>-/-</sup>

Die Auswertung der Versuchsreihe Quinin ( $10^{-4}$  M) erfolgte anhand von 5 PCLS von 4 OCT3<sup>-/-</sup>-Mäusen. Nach Bronchokonstriktion infolge 5-HT-Applikation (1  $\mu\text{M}$ ) betrug innerhalb 15 Minuten die minimale luminalen Fläche durchschnittlich  $40 \pm 17$  % (Abb. 12, luminaler Anfangsdurchmesser:  $190 \pm 18$   $\mu\text{m}$ ). Die Inkubation der PCLS mit Quinin ( $10^{-4}$  M) führte wie bei WT-Bronchi zu einer

Hemmung der Kontraktion durch 5-HT. Es zeigte sich hierbei eine Restfläche von  $77 \pm 14$  % (während 15 Minuten, Abb. 12), was einer im Verhältnis um 60 % geringeren Konstriktion entspricht. Im Wilcoxon-Test zeigte sich mit  $p = 0.043$  ein signifikanter Unterschied. Verglichen mit PCLS vom WT war bei der inhibitorischen Wirkung von Quinin ( $10^{-4}$  M) kein signifikanter Unterschied festzustellen ( $p = 0.690$ , Mann-Whitney-Test).



**Abbildung 12:** Graphische Darstellung der Versuchsreihe mit Quinin ( $10^{-4}$  M). Die Abb. zeigt die durchschnittliche luminale Bronchusfläche in [%] in Abhängigkeit von der Zeit bei FVB-, OCT1/2<sup>-/-</sup> und OCT3<sup>-/-</sup>-PLCS. Die Nummern in Klammern entsprechen der Zahl der Bronchi/Zahl der Lungen, aus welchen sie entnommen wurden.



**Abbildung 13:** Die Boxplots illustrieren die innerhalb der Substanzverweilzeit gemessene maximale Stärke der 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion in Anwesenheit von Atropin ( $10^{-4}$  M), Corticosteron ( $10^{-6}$  M) und Quinin ( $10^{-4}$  M) bei FVB-, OCT1/2<sup>-/-</sup>- und OCT3<sup>-/-</sup>-Bronchi, angegeben als Prozentzahl der 5-HT-induzierten Kontraktion, welche 100 % gesetzt wurde. Die Boxplots zeigen die 0, 25, 50, 75 und 100 Perzentile. Signifikante Unterschiede im Wilcoxon-Test zwischen der 5-HT-induzierten und der durch den Inhibitor reduzierten Bronchokonstriktion innerhalb eines Mäusestamms sind mit \*\* $p > 0.01$ , \* $p < 0.05$  gekennzeichnet.

## **4.2 Versuchsreihe mit PCLS von MR2/3<sup>-/-</sup>- und korrespondierenden WT-Mäusen**

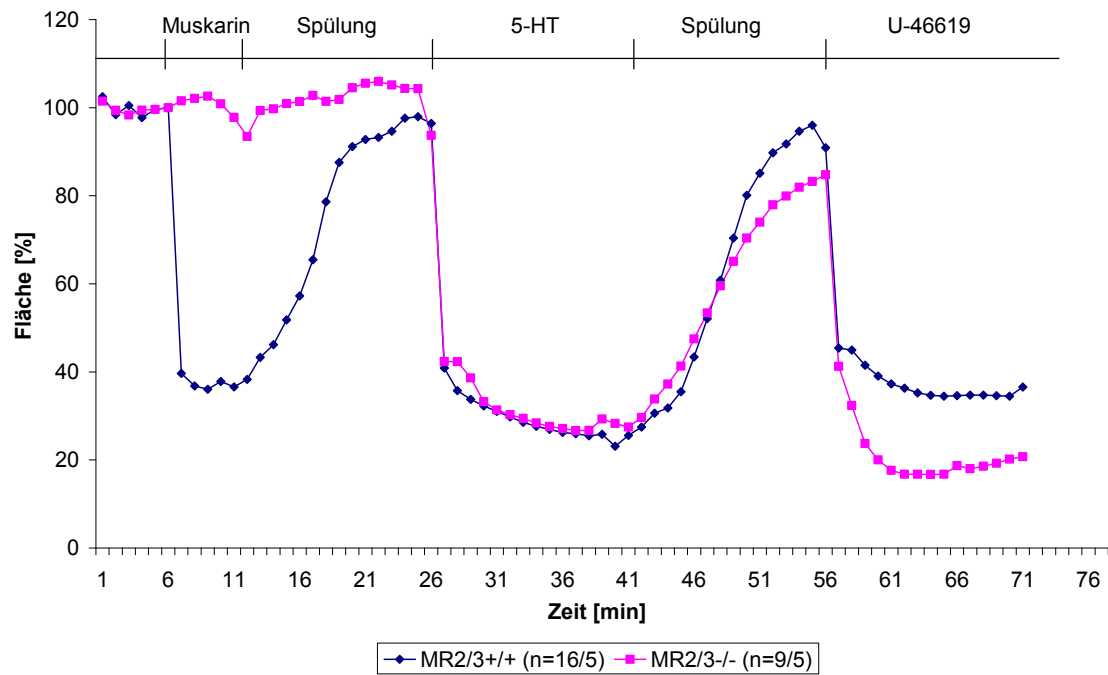
### **4.2.1 Muskarin- ( $10^{-6}$ M), 5-HT- ( $10^{-6}$ M) und U-46619- ( $10^{-5}$ M) induzierte Bronchokonstriktion**

#### MR2/3<sup>+/+</sup>

Zur Klärung der Fragestellung, ob ACh in die 5-HT-induzierte Bronchokonstriktion involviert ist, erfolgte die Durchführung einer Versuchsreihe mit MR2/3<sup>-/-</sup>- und korrespondierenden WT-Mäusen MR2/3<sup>+/+</sup> und den drei konstriktorischen Teststimuli Muskarin ( $10^{-6}$  M), 5-HT ( $10^{-6}$  M) und U-46619 ( $10^{-5}$  M). In die Auswertung der WT-Tiere wurden 16 Versuche von 5 Mäusen mit einem durchschnittlichen Anfangsdurchmesser der Bronchi von  $201 \pm 35$   $\mu$ m miteinbezogen. Sowohl Muskarin ( $10^{-6}$  M) als auch 5-HT ( $10^{-6}$  M) sowie U-46619 ( $10^{-5}$  M) führten innerhalb der Verweilzeit zu einer Kontraktion der WT-PCLS mit folgenden Werten: Luminale Restfläche nach Muskarin-Applikation von  $36 \pm 20$  % (Abb. 14), nach 5-HT-Zugabe von  $25 \pm 18$  % und infolge U-46619-Applikation von  $34 \pm 15$  % (Abb. 14).

#### MR2/3<sup>-/-</sup>

Im Gegensatz zu Bronchi des WT zeigten PCLS von MR2/3<sup>-/-</sup>-Mäusen nach Applikation von Muskarin (1  $\mu$ M) keine Kontraktion (Bronchusfläche von  $100 \pm 3$  %, Abb. 14). 5-HT  $10^{-6}$  M und U-46619  $10^{-5}$  M dagegen führten wie bei WT-Tieren während der Einwirkzeit zu einer Reduktion der luminalen Bronchusfläche auf minimal  $27 \pm 19$  % infolge 5-HT-Wirkung und auf  $17 \pm 6$  % nach U-46619-Applikation (Abb. 14). Durchschnittlich betrugen die Bronchi zu Beginn im Durchmesser  $177 \pm 43$   $\mu$ m, wobei 9 PCLS von 5 MR2/3<sup>-/-</sup>-Mäusen ausgewertet wurden.



**Abbildung 14: Graphische Darstellung der Versuchsreihe mit PCLS von MR2/3<sup>-/-</sup>- und MR2/3<sup>+/+</sup>-Tieren. Die Abb. zeigt die durchschnittliche luminale Bronchusfläche in [%] in Abhängigkeit von der Zeit bei MR2/3<sup>+/+</sup>-und MR2/3<sup>-/-</sup>-PCLS. Die Nummern in Klammern entsprechen der Zahl der Bronchi/Zahl der Lungen, aus welchen sie entnommen wurden.**

	FVB		OCT1/2 <sup>-/-</sup>		OCT3 <sup>-/-</sup>	
	Muskarin	5-HT	Muskarin	5-HT	Muskarin	5-HT
Versuch	Fläche [%]	Fläche [%]	Fläche [%]	Fläche [%]	Fläche [%]	Fläche [%]
1	38	37	33	36	25	31
2	48	64	38	33	38	38
3	41	44	23	32	67	71
4	36	27	52	38	28	34
5	3	14	20	30	44	28
6	60	43	51	73	54	36
7	52	53	38	45	63	48
8	42	36	12	19	61	36
9	37	36	29	37	61	55
10	33	29	19	25	41	39
11	29	33	33	38	47	41
12	12	7	39	53	67	55
13	32	18	34	37	19	17
14	37	31	33	27	40	42
15	49	53	40	26	31	29
16	61	52	24	37	51	58
17	55	31	23	26		
18			32	49		
19			16	42		
20			33	36		
MW	39	36	31	37	46	41
S. D.	17	16	11	12	15	13

**Tabelle 5: Minimale luminale Fläche [%] nach Muskarin- (1 µM) bzw. 5-HT-Applikation (1 µM) bei FVB-, OCT1/2<sup>-/-</sup>- und OCT3<sup>-/-</sup>-PCLS**

Tabelle 5 zeigt die für jeden Versuch bei FVB-, OCT1/2<sup>-/-</sup>- und OCT3<sup>-/-</sup>-Tieren während der Substanzverweilzeit gemessene minimale luminale Bronchusfläche in % nach Applikation von Muskarin (1 µM) bzw. 5-HT (1 µM).

Versuch		FVB	OCT1/2 <sup>-/-</sup>	OCT3 <sup>-/-</sup>		FVB	OCT1/2 <sup>-/-</sup>	OCT3 <sup>-/-</sup>
		Fläche [%]	Fläche [%]	Fläche [%]		Fläche [%]	Fläche [%]	Fläche [%]
1	5-HT	37	36	31	5-HT + Atropin	91	91	99
2		64	33	38		104	92	74
3		44	32	71		92	94	89
4		27	38	34		90	93	91
5		14	30			78	88	
6			73				95	
	MW	37	40	44	MW	91	92	88
	S. D.	19	16	19	S. D.	9	2	10
1	5-HT	43	45	28	5-HT + Corticosteron	70	89	19
2		53	19	36		63	87	29
3		36	37	48		44	65	51
4		36	25	36		53	52	47
5		29	38	55		38	60	63
6		33	53	39		58	71	66
7		7	37	41		24	49	48
	MW	34	36	40	MW	50	68	46
	S. D.	14	11	9	S. D.	16	16	17
1	5-HT	18	27	55	5-HT + Quinin	87	81	91
2		31	26	17		82	90	85
3		53	37	42		91	80	58
4		52	26	29		86	81	66
5		31	49	58		72	91	84
6			42				88	
7			36				90	
	MW	37	35	40	MW	84	86	77
	S. D.	15	9	17	S. D.	7	5	14

Tabelle 6: Minimale luminale Fläche [%] nach 5-HT- bzw. 5-HT + Inhibitor-Applikation bei FVB-, OCT1/2<sup>-/-</sup>-, OCT3<sup>-/-</sup>-PCLS



Tabelle 6 zeigt die pro Versuchsreihe für jeden Versuch während der Substanzverweilzeit gemessene minimale luminale Bronchusfläche [%] nach 5-HT ( $1 \mu\text{M}$ ) - bzw. 5-HT + Inhibitor-Applikation (Atropin  $10^{-4}$  M, Corticosteron  $10^{-6}$  M, Quinin  $10^{-4}$  M) bei FVB-, OCT1/2<sup>-/-</sup>-, OCT3<sup>-/-</sup>-PCLS.

## **5 Diskussion**

### **5.1 Methodische Aspekte**

#### **5.1.1 Verwendung von PCLS**

Zur Beantwortung der Fragestellung wurden PCLS aus der Mäuselunge angefertigt. Da das Gewebe vital und der Atemweg in sein ursprüngliches Parenchym eingebettet ist, kann er aktiv auf Stimuli unterschiedlicher Art reagieren. Diese Form der Präparation ermöglicht eine Untersuchung der kleinen Luft leitenden Atemwege im Gewebeverband, was sich der Untersuchung im lebenden Organismus annähert, jedoch unter weitgehend standardisierten Bedingungen. Die Methode, Lungenschnitte zur Ermittlung der Bronchokonstriktion zu verwenden, wurde 1993 erstmals von Dandurand et al. [63] beschrieben. Die 500–1000  $\mu\text{m}$  dicken Lungenschnitte wurden aus Rattenlungen gewonnen und unter Zellkulturbedingungen gelagert. Eine auf dieser Methode basierende Technik entwickelte 1996 die Arbeitsgruppe um Martin et al. [13]. Mit dieser konnten 250  $\mu\text{m}$  dicke Lungenschnitte aus Mäuselungen erstellt werden. Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Methode zur Erstellung von PCLS aus der Mäuselunge lehnt sich an das von Martin et al. [13] beschriebene Verfahren an. Zu beachten war hierbei, dass die kurz vor der Präparation der Maus hergestellte Agarose einige Minuten im Wärmeschränk (37 °C) abkühlen sollte, da ein Befüllen der Lunge mit der

kochend heißen Agarose zum Vitalitätsverlust der PCLS führt. Ebenso hätte ein Überfüllen der Lunge mit Agarose die Beschädigung der Bronchialmuskulatur mit eingeschränkter Vitalität der PCLS zur Folge gehabt. Die Lagerung der PCLS erfolgte im Inkubationsschrank bei 37 °C. Bei dieser Temperatur verflüssigt sich die Agarose wieder und ein Herausspülen aus den PCLS ist möglich. Unter Standardzellkulturbedingungen bleiben PCLS für 1 Tag vital, wohingegen mit einem dynamischen System die Vitalität bis zu 3 Tagen erhalten werden kann [14]. Zusätzlich ersparte die Anwendung eines dynamischen Systems mit Begasung der PCLS unter Normoxiebedingungen das Wechseln des Mediums und aufgrund der ständigen Bewegung des Mediums durch die Gaszufuhr verbesserte sich der Wascheffekt der PCLS.

### **5.1.2 Mikroskopie und Auswertung der PCLS**

Zur Bestimmung der Kontraktion wurde die Fläche des Bronchus anhand der Epithelgrenze festgelegt und mit Hilfe des Analyse-Programms Stemmer Imaging Optimas 6.5 ausgemessen. Zur Darstellung einer Bronchokonstriktion ist die Fläche im Gegensatz zum Durchmesser die geeignetere Form, da der Durchmesser mit Hilfe eines idealisierten Kreises berechnet wird. Dieser wird der ursprünglichen Fläche eines Bronchus nicht gerecht, da sich ein Bronchus nicht gleichmäßig kreisförmig kontrahiert. Pathophysiologisch entscheidend für den Luftstrom ist die Fläche und nicht der Durchmesser, weshalb in der vorliegenden Studie immer die Bronchusfläche zur Darstellung der Kontraktion gewählt wurde. Die luminale Fläche eines Bronchus im Ruhezustand wurde als 100 % definiert, während Kontraktion und Dilatation als prozentuale Ab- bzw. Zunahme dieser Fläche angegeben wurden.

### **5.1.3 Eignung der PCLS für pharmakologische Studien**

Die Vitalität der PCLS wurde durch eine mikroskopisch sichtbare Kontraktion des Bronchus infolge Muskarinapplikation (1 µM) festgestellt. Zur Einbeziehung des PCLS in die Auswertung musste sich die luminale Bronchusfläche in

Anwesenheit von Muskarin um mindestens 30 % reduziert haben. Weitere Bedingungen waren die Integrität der glatten Bronchialmuskulatur und die Kontinuität der Epithelgrenze, um ein exaktes Vermessen der luminalen Fläche zu ermöglichen. Im Bronchiallumen befindlicher Zelldetritus, Blut oder Agarose führten zum Ausschluss des PCLS. Ebenso von den Messungen ausgeschlossen wurden vorkontrahierte PCLS, da der initiale Tonus zu verfälschten Ergebnissen geführt hätte. Eine Präinkubation der PCLS mit einem Bronchodilatator hätte nach Martin et al. [13] keine Änderung des initialen Bronchuslumens bewirkt. PCLS, die nicht den Qualitätskriterien entsprachen (siehe Tabelle 3), wurden von den Versuchen ausgeschlossen. Zur besseren Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit wurden Bronchi gleichen Durchmessers von ca. 200 µm gewählt. Bronchi der Atemwege von Mäusen mit diesem Durchmesser entsprechen in ihrer Struktur den terminalen Bronchioli des Menschen [13].

## **5.2 Cholinerge Komponente der Serotonin-induzierten Bronchokonstriktion**

Ausgangspunkt der Untersuchungen zur Klärung einer cholinergen Beteiligung an der 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion war die zu Beginn dieser Arbeit aufgestellte Hypothese einer 5-HT-induzierten ACh-Freisetzung aus dem Atemwegsepithel durch die OCT.

Die cholinerge Regulation der Atemwege von Säugetieren erfolgt über ein neuronales und ein non-neuronales cholinerges System, welche in Epithelzellen der Atemwege unabhängig voneinander arbeiten. Transmitter dieser Systeme ist ACh. Epithelzellen enthalten sowohl non-neuronales ACh als auch das Synthesenzym ChAT sowie nikotinische und muskarinische ACh-Rezeptoren [5, 6, 53]. Zudem exprimieren sie den hoch-affinen Cholintransporter CHT1 [56]. Mit welchen Mechanismen non-neuronale Zellen ACh freisetzen, ist bislang unklar. Zilientragende Epithelzellen der Atemwege enthalten keine ACh-gefüllten Speichervesikel und auch nicht das vesikuläre ACh-Aufnahmesystem

VACHT [8]. Wessler et al. [10] berichteten in einer Veröffentlichung, dass in menschlichen Plazentazotten die Freisetzung von non-neuronalem ACh durch Inhibitoren der OCT gehemmt werden konnte, und schlossen hieraus eine OCT-vermittelte ACh-Freisetzung aus non-neuronalen Zellen. Kürzlich zeigte die Arbeitsgruppe um Lips et al. [8] mittels RT-PCR und Immunfluoreszenz, dass die OCT-Subtypen OCT1 und OCT2 in der luminalen und OCT3 zudem in der basolateralen Membran zilientragender Epithelzellen des Tracheal- und Bronchialepithels von Ratten und Menschen lokalisiert sind. Die an OCT-exprimierenden-*Xenopus laevis*-Oocyten durchgeführten Messungen belegten zudem, dass OCT1 und OCT2, im Gegensatz zu OCT3, ACh aus der Zelle transportieren können. Mit dieser Studie lieferten Lips et al. [8] einen Hinweis auf eine ACh-Freisetzung aus Epithelzellen durch die OCT-Subtypen OCT1 und OCT2. Nach einer Veröffentlichung von Moffatt et al. [13] entsteht die in der Trachea von Nagern durch 5-HT-induzierte Kontraktion neben der direkten Stimulation der 5-HT-Rezeptoren zusätzlich infolge einer ACh-Freisetzung aus dem Epithel [3]. Diese Hypothese resultierte aus der Beobachtung, dass bei zerstörtem Trachealepithel eine Kontraktion auf 5-HT ausblieb, und dass der Muskarinrezeptorantagonist Atropin die 5-HT-induzierte Kontraktion hemmte, im Gegensatz zu Neurotoxinen [3]. Dieser Untersuchung zufolge leistet das Epithel vermutlich einen wichtigen Beitrag zu der 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion. Trotz der von Moffatt et al. [13] aufgestellten Hypothese war jedoch zu Beginn der vorliegenden Studie unklar, ob 5-HT zu einer ACh-Freisetzung aus dem Bronchialepithel mittels der OCT und somit zur Bronchokonstriktion führt, oder ob ein anderer konstriktorischer Faktor aus den Epithelzellen freigesetzt wird.

### **5.2.1 Versuchsreihe mit MR-Subtypen 2- und 3-defizienten PCLS**

Um zu klären, inwiefern ACh, wie zu Beginn der Arbeit angenommen, an der 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion beteiligt ist, wurde eine Versuchsreihe mit MR2/3<sup>-/-</sup>-Tieren und dem korrespondierenden WT-Mäusestamm durchgeführt. Glatte Muskelzellen der Atemwege von Mäusen exprimieren die MR-Subtypen 1, 2 und 3 [61]. Die Kontraktion der peripheren Atemwege in Mäusen erfolgt

nach Struckmann et al. [15] durch die Aktivierung der M2- und M3-Rezeptoren, wohingegen der M1-Rezeptor vermutlich durch Freisetzung eines relaxierenden Faktors an der Bronchodilatation beteiligt ist. PCLS von MR2/3-defizienten Mäusen zeigten bei der Studie von Struckmann et al. [15] nach kumulativer Applikation von Muskarin  $10^{-8}$ – $10^{-4}$  M keine Bronchokonstriktion. Nach Moffatt et al. erfolgt die 5-HT-induzierte Kontraktion der Nagertrachea durch epitheliale ACh-Freisetzung [3]. Bereits in früheren Studien von Eum et al. [1] und Levitt und Mitzner et al. [2] wurde eine Beteiligung von ACh an der 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion diskutiert, da Muskarinrezeptorantagonisten wie Atropin die 5-HT-induzierte Kontraktion hemmten. In der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch die Resultate der Versuchsreihe mit PCLS von MR2/3<sup>-/-</sup>-Mäusen, dass ACh an der Kontraktion durch 5-HT nicht beteiligt ist. Wie auch bei Struckmann et al. [15] beobachtet, erfolgte nach Zugabe von Muskarin  $10^{-6}$  M keine Kontraktion der Bronchi von MR2/3-defizienten Tieren. Im Gegensatz hierzu führte die Applikation eines weiteren konstriktorisches Stimulus (U-46619  $10^{-5}$  M) sowohl beim WT als auch bei MR2/3<sup>-/-</sup>-Tieren zu einer Kontraktion. Das Thromboxan-A<sub>2</sub>-Analogon U-46619 zählt zu den Eicosanoiden und ist in den Atemwegen der Maus ein potenter Bronchokonstriktor [64]. Ebenso erfolgte nach Zugabe von 5-HT  $10^{-6}$  M bei beiden Mäusestämmen eine unvermindert starke Bronchokonstriktion. Entsprechend der Tatsache, dass Muskarin zu keiner Beeinflussung des Bronchotonus bei PCLS von MR2/3<sup>-/-</sup>-Tieren führte, kann die Kontraktion infolge 5-HT nicht durch eine ACh-Freisetzung erfolgen. Ein anderer, vermutlich epithelialer, Faktor als ACh ist demnach an der 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion beteiligt, dessen Identifikation in Zukunft eine neue Herausforderung darstellen wird.

### 5.3 Beteiligung der OCT-Subtypen OCT1 und OCT2 an der Bronchokonstriktion

Eine frühere Studie von Lips et al. [8] zeigte, dass die OCT-Subtypen OCT1, OCT2 und OCT3 in den meisten Zelltypen des respiratorischen Epithels von Nagerlungen exprimiert sind, und dass OCT1 und OCT2 in vitro ACh transportieren können. Nach der anfangs aufgestellten Hypothese einer 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion infolge epithelialer ACh-Freisetzung durch OCT1 oder OCT2 sollte in OCT1/2-defizienten Mäusen eine reduzierte 5-HT-induzierte Kontraktion erfolgen. In der vorliegenden Untersuchung führte Muskarin (1  $\mu$ M), das zu Beginn als Teststimulus appliziert wurde, bei PCLS von OCT1/2<sup>-/-</sup>-Mäusen zu einer signifikant stärkeren Bronchokonstriktion als 5-HT (1  $\mu$ M). Bronchi von OCT3<sup>-/-</sup>- und WT-Tieren wiesen im Vergleich zu OCT1/2<sup>-/-</sup>-Bronchi eine schwächere Muskarin-induzierte Kontraktion auf, wohingegen 5-HT (1  $\mu$ M) entgegen den Erwartungen bei allen eine ähnlich starke Bronchokonstriktion hervorrief. Resultierend hieraus zeigt sich, dass die 5-HT-induzierte Bronchokonstriktion unabhängig von den OCT-Subtypen OCT1 und OCT2 erfolgt. Basierend auf der stärkeren Reaktion der OCT1/2<sup>-/-</sup>-Bronchi auf Muskarin lässt sich die Hypothese aufstellen, dass OCT1 oder OCT2 einen relaxierenden Faktor aus dem Epithel freisetzt. Struckmann et al. [15] berichteten bereits 2003 von einem MR1-abhängigen Weg, der der cholinergen Bronchokonstriktion durch Freisetzung relaxierender Substanzen entgegenwirkt. In PCLS von MR1-defizienten Mäusen bewirkte Muskarin (10<sup>-8</sup> M) eine signifikant höhere Bronchokonstriktion als im WT. Zudem zeigte sich bei MR1<sup>-/-</sup>-Tieren nach Muskarinapplikation keine transiente Relaxation [15]. M1-Rezeptoren werden neben sympathischen Nervenendigungen der glatten Bronchialmuskulatur auch auf respiratorischen Epithelzellen exprimiert [15, 65]. Diese enthalten u. a. auch relaxierende Faktoren wie das Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) [66]. Verschiedene Autoren berichteten bereits über die relaxierende Wirkung der Prostaglandine PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , PGE<sub>2</sub> und PGE<sub>1</sub> auf den Bronchotonus [64]. Trotz der Tatsache, dass Prostaglandine zu den Anionen zählen, können die OCT, insbesondere der Subtyp OCT1, nach Kimura et al. [39] PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  transportieren. Demzufolge wäre eine MR1-vermittelte Freisetzung von

PGE<sub>2</sub> durch OCT1 und OCT2 aus dem Bronchialepithel mit daraus resultierender Bronchodilatation möglich. Zusammenfassend suggerieren die vorliegenden Daten einerseits das Bestehen einer epithelialen MR1-Rezeptor- und OCT1/2-abhängigen Relaxation durch Freisetzung von PGE<sub>2</sub> und zeigen andererseits, dass die 5-HT-induzierte Bronchokonstriktion unabhängig von den Subtypen OCT1 und OCT2 erfolgt.

#### **5.4 Beteiligung des OCT-Subtyps OCT3 an der Bronchokonstriktion**

Verschiedene Autoren berichteten, dass das Glucocorticoid Corticosteron die Aktivität der OCT inhibiert, ohne dabei selbst von diesen transportiert zu werden [17, 30]. Die Hemmung des OCT-vermittelten Transports durch Corticosteron kann sowohl von der intra- als auch von der extrazellulären Seite erfolgen, wobei die Affinität für Corticosteron im Zellinneren höher ist als an der Zellaußenseite [17]. Die höchste Affinität für Glucocorticoide besitzt unter den drei OCT-Subtypen der OCT3, welcher auch als EMT bezeichnet wird [17]. Um herauszufinden, ob Corticosteron auch zu einer Reduktion der 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion führt, und welche OCT-Subtypen daran beteiligt sind, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Versuchsreihe mit Corticosteron (1 µM) mit PCLS von OCT1/2<sup>-/-</sup>, OCT3<sup>-/-</sup> und den entsprechenden WT-Tieren (FVB) durchgeführt. In humanen Bronchialarterien hemmt Corticosteron (1 µM) durch Bindung an den OCT3 der glatten Muskulatur die Norepinephrin-Aufnahme aus dem Extrazellularraum [37]. Innerhalb der vorliegenden Studie zeigte sich, dass Corticosteron 10<sup>-6</sup> M in Lungen von OCT1/2<sup>-/-</sup> und FVB-Mäusen signifikant die 5-HT-induzierte Bronchokonstriktion reduzierte, wohingegen bei PCLS von OCT3<sup>-/-</sup>-Tieren die Anwesenheit von Corticosteron zu keiner Hemmung der Kontraktion führte. Der bei OCT1/2<sup>-/-</sup> und FVB-Mäusen beobachtete inhibitorische Effekt war bei OCT3<sup>-/-</sup>-Tieren nicht vorhanden. Diese Daten deuten darauf hin, dass Corticosteron durch spezifische Blockade des OCT-Subtyps OCT3 zu einer Reduktion der 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion

führt. Eine Hemmung der Kontraktion kann, wie bei dem OCT3 der Bronchialarterien [37], durch eine direkte Reaktion des Corticosterons mit dem OCT3 der glatten Bronchialmuskulatur erfolgen, oder auch möglicherweise durch Bindung des Glucocorticoids an den OCT3 des Bronchialepithels. Da OCT3 an der Beseitigung von Monoaminen einschließlich der Katecholamine und 5-HT aus dem Extrazellularraum beteiligt ist, sollte bei einer Blockade des Transporters deren extrazelluläre Konzentration ansteigen. Demzufolge würde eine Blockade des OCT3 der Atemwege zu einer verlängerten  $\beta$ -adrenergen dilatatorischen Wirkung und somit reduzierten 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion führen. Das Corticosteroid-induzierte Auftreten einer akuten Vasokonstriktion der Bronchialarterien des Menschen wird demnach auch mit einer Hemmung des OCT3 durch Corticosteron mit folgendem extrazellulärem Anstieg von Noradrenalin und verlängerter Aktivierung von  $\alpha$ 1-Adrenorezeptoren erklärt [37]. In der Lunge erfolgt jedoch eine hohe Expression von spezifischen 5-HT-Transportern (SERT), wodurch fehlende bzw. blockierte OCT3 die 5-HT-Kinetik nicht beeinflussen [12]. Dies erklärt die unveränderte Reaktion der OCT3<sup>-/-</sup>-Mäuse auf 5-HT. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass 5-HT auf zwei verschiedenen Wegen zu einer Bronchokonstriktion führt. Einerseits infolge direkter Stimulation der 5-HT-Rezeptoren und andererseits durch Freisetzung eines vermutlich epithelialen konstriktorischen Faktors, der nicht ACh ist. Eine Blockade des muskulären oder des epithelialen OCT3 mit Corticosteron bewirkt eine reduzierte 5-HT-induzierte Kontraktion.

## **5.5 Inhibitorischer Effekt von Atropin**

Der Muskarinrezeptorantagonist Atropin hemmt durch Blockade muskarinischer Rezeptoren die cholinerge Kontraktion, welche in Atemwegen von Mäusen infolge Aktivierung der MR-Subtypen 2 und 3 erfolgt [15]. Verschiedene Autoren berichteten, dass die Anwesenheit von Atropin und anderen Muskarinrezeptorantagonisten dosisabhängig zu einer Reduktion der 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion führt, und schlossen hieraus eine Beteiligung



von ACh an der Kontraktion in Mäuseatemwegen [1, 2, 15, 58]. Nach Moffatt et al. [3] beruht dieser Effekt auf einer 5-HT-induzierten Freisetzung von non-neuronalem ACh aus Epithelzellen. In der vorliegenden Studie hemmt Atropin  $10^{-4}$  M sowohl bei Ko-Tieren (OCT1/2<sup>-/-</sup>, OCT3<sup>-/-</sup>) als auch bei den korrespondierenden WT-Mäusen (FVB) fast vollständig die durch 5-HT-induzierte Kontraktion der Bronchi. Bei einer weiteren Untersuchung der Arbeitsgruppe um Kummer et al. [67] zeigte sich zudem, dass Atropin ( $10^{-4}$  M) sogar in PCLS von MR2/3<sup>-/-</sup>-Mäusen, welche keine Reaktion auf cholinerge Stimulation mit Muskarin (1  $\mu$ m) aufweisen, komplett die 5-HT-induzierte Bronchokonstriktion inhibiert. Eine ACh-induzierte und demnach mit dem Muskarinrezeptorantagonisten hemmbare Kontraktion ist jedoch in MR2- und MR3-defizienten Bronchi nach Struckmann et al. nicht möglich [15]. Ebenso zeigten die zu Beginn dieser Arbeit dargestellten Daten aus Untersuchungen an PCLS von MR2/3<sup>-/-</sup>-Mäusen, dass ACh nicht in die 5-HT-induzierte Bronchokonstriktion involviert ist, sondern ein anderer konstriktorischer Faktor. Demzufolge sollte die Anwesenheit von Atropin zu keiner Beeinflussung der Kontraktion von PCLS infolge 5-HT-Applikation führen. Dennoch konnte mit dem Muskarinrezeptorantagonisten Atropin  $10^{-4}$  M sowohl in OCT<sup>-/-</sup>- als auch in MR2/3<sup>-/-</sup>-Tieren eine vollständige Blockade der Bronchokonstriktion durch 5-HT erzielt werden. Bereits in einer früheren Veröffentlichung von Fan et al. [68] wurde Atropin als kompetitiver Antagonist zu dem 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor beschrieben, was die inhibitorische Wirkung des Muskarinrezeptorantagonisten auf die 5-HT-induzierte Kontraktion erklären könnte. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass durch Atropin in dieser Dosierung eine unspezifische Hemmung von nicht muskarinischen Rezeptoren erfolgt.

## 5.6 Inhibitorischer Effekt von Quinin

Der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte OCT-Inhibitor Quinin ( $10^{-4}$  M) reduzierte in OCT1/2<sup>-/-</sup>-, OCT3<sup>-/-</sup>- und FVB-Mäusen signifikant die 5-HT-induzierte Bronchokonstriktion. In humanen Plazentazotten führte Quinin zu

einer konzentrationsabhängigen Hemmung der die OCT-vermittelte Freisetzung von non-neuronalem ACh [10]. Da die Plazenta weder extrinsisch noch intrinsisch innerviert wird, schlossen Wessler et al. [10] aus der Reduktion der ACh-Freisetzung durch Quinin, dass die OCT-Subtypen OCT1 und OCT3 ACh aus non-neuronalen Zellen transportieren. Die innerhalb dieser Studie durchgeführten Untersuchungen zeigten jedoch, dass 5-HT nicht zu einer ACh-Freisetzung aus Epithelzellen via OCT führt. Nach Lips können OCT1 und OCT2 ACh in und aus respiratorischen Epithelzellen transportieren [8]. Dieser Transport ist, wie die Versuche mit MR2/3<sup>-/-</sup>-Tieren zeigten, jedoch nicht 5-HT induziert. 5-HT bewirkt nicht via OCT die Freisetzung von epitheliale ACh und somit Bronchokonstriktion, sondern induziert diese mittels eines anderen epithelialen Faktors. Der in allen Mäusestämmen persistierende inhibitorische Effekt von Quinin muss als unspezifisch betrachtet werden, da Quinin in dieser Dosierung (10<sup>-4</sup> M) nicht nur spezifisch die OCT hemmt, sondern auch weitere Rezeptoren, wie die 5-HT-Rezeptoren [12].

## 5.7 Schlussfolgerung

Zusammenfassend widerlegen die innerhalb der vorliegenden Arbeit erfassten Daten die ursprüngliche Hypothese einer Beteiligung von ACh an der 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion, schließen aber eine OCT-vermittelte epitheliale ACh-Freisetzung in Folge eines anderen Stimulus als 5-HT nicht aus. Die Bronchokonstriktion der PCLS MR2/3-defizienter Mäuse nach 5-HT-Applikation (1 µM) zeigt, dass ein anderer konstriktorischer Faktor als ACh durch 5-HT freigesetzt wird. Die Hemmung der 5-HT-induzierten Kontraktion mit dem Muskarinrezeptorantagonisten Atropin (10<sup>-4</sup> M) ist unspezifisch, da sowohl in MR2/3<sup>-/-</sup>- als auch in OCT<sup>-/-</sup>-Tieren der inhibitorische Effekt bestehen bleibt. Die verstärkte Reaktion der OCT1/2<sup>-/-</sup>-Mäuse auf Muskarin (1 µM) liefert einen Hinweis auf das Vorhandensein einer epithelialen MR1- und OCT1/2-abhängigen Bronchodilatation durch Freisetzung einer relaxierenden Substanz.

Resultierend aus der gleich bleibenden Kontraktion der OCT1/2<sup>-/-</sup>-Bronchi auf 5-HT (1 µM) erfolgt die 5-HT-induzierte Bronchokonstriktion unabhängig von den OCT-Subtypen OCT1 und OCT2. Der OCT-Subtyp OCT3 dagegen ist indirekt an der 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion beteiligt. Eine Hemmung dieses Mechanismus ist mit dem Glucocorticoid Corticosteron (1 µM) möglich durch direkte Bindung von Corticosteron an den OCT3 der glatten Muskulatur oder durch Blockade des epithelialen OCT3.

## 6 Zusammenfassung

Die Atemwege der Maus reagieren sowohl auf Serotonin (5-HT) als auch auf Acetylcholin (ACh) mit einer Konstriktion. Früheren Veröffentlichungen zufolge basiert die 5-HT-induzierte Bronchokonstriktion auf zwei verschiedenen Mechanismen. Einerseits über die direkte Stimulation der 5-HT-Rezeptoren der Atemwege und andererseits indirekt über die Freisetzung von ACh [1]. Nach Moffatt et al. [3] erfolgt die 5-HT-induzierte Kontraktion der Mäusetrachea durch non-neuronale ACh-Freisetzung aus dem Trachealepithel. Lips et al. [8] zeigten kürzlich, dass die organischen Kationentransporter OCT1 und OCT2, die in einer Vielzahl von non-neuronalen Zellen und auch in den meisten respiratorischen Epithelzelltypen exprimiert werden, im Gegensatz zum OCT3 in vitro ACh transportieren. Basierend hierauf entstand die Hypothese, dass 5-HT neben der direkten Wirkung auch eine Freisetzung von ACh aus dem Atemwegsepithel via OCT induziert und somit eine Bronchokonstriktion auslöst. Zur Überprüfung dieser Hypothese diente die Videomorphometrie am Modell der vitalen Lungenschnittpräparationen (Precision-Cut Lung Slices, PCLS). An zwei OCT-defizienten Mäusestämmen, OCT1/2<sup>-/-</sup> und OCT3<sup>-/-</sup>, und dem korrespondierenden Wildtyp (WT)-Mäusestamm wurde die Bronchokonstriktion und deren Inhibition durch Atropin (10<sup>-4</sup> M), Corticosteron (10<sup>-6</sup> M) und Quinin (10<sup>-4</sup> M) untersucht. Zur Klärung der cholinergen Komponente der 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion erfolgte zudem eine Versuchsreihe mit Muskarinrezeptor (MR)-2/3-defizienten Mäusen, die bekanntermaßen auf Stimulation durch Muskarin keine Bronchokonstriktion zeigen [15], und dem korrespondierenden WT.

Muskarin (1 µM) führte in OCT1/2<sup>-/-</sup>-Mäusen zu einer signifikant stärkeren Bronchokonstriktion als 5-HT (1 µM), wohingegen OCT3<sup>-/-</sup>- und WT-Bronchi im Vergleich zu OCT1/2<sup>-/-</sup>-Bronchi eine schwächere Muskarin-induzierte Kontraktion aufwiesen. Die 5-HT-induzierte Bronchokonstriktion war, im Vergleich zum korrespondierenden WT, sowohl bei OCT<sup>-/-</sup>- als auch MR2/3<sup>-/-</sup>-Tieren, die auf cholinerge Stimulation nicht reagierten, unverändert. Der inhibitorische Effekt von Atropin (10<sup>-4</sup> M) blieb in allen OCT<sup>-/-</sup>-, WT- und sogar in MR2/3<sup>-/-</sup>-Tieren bestehen. Corticosteron (10<sup>-6</sup> M) hemmte in OCT1/2<sup>-/-</sup>- und WT-

Mäusen signifikant die 5-HT-induzierte Bronchokonstriktion, während sich bei OCT3<sup>-/-</sup>-Bronchi keine inhibitorische Wirkung des Glucocorticoids zeigte.

Die innerhalb der vorliegenden Arbeit erfassten Daten widerlegen die ursprüngliche Hypothese einer Beteiligung von ACh an der 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion, schließen aber eine OCT-vermittelte epitheliale ACh-Freisetzung in Folge eines anderen Stimulus als 5-HT nicht aus. Die Bronchokonstriktion der MR2/3-defizienten Mäuse nach 5-HT-Applikation zeigt, dass ein anderer konstriktorischer Faktor als ACh durch 5-HT freigesetzt wird. Atropin ( $10^{-4}$  M) ist in dieser Dosierung als unspezifisch zu betrachten, da die Hemmung der 5-HT-induzierten Kontraktion sogar in MR2/3<sup>-/-</sup>-Mäusen bestehen bleibt. Einen Hinweis auf das Vorhandensein einer epithelialen MR1- und OCT1/2-abhängigen Bronchodilatation durch Freisetzung einer relaxierenden Substanz liefert die verstärkte Reaktion der OCT1/2<sup>-/-</sup>-Mäuse auf Muskarin. Die 5-HT-induzierte Bronchokonstriktion erfolgt, resultierend aus der gleich bleibenden und nicht, wie erwartet, verminderten Kontraktion der OCT1/2<sup>-/-</sup>-Bronchi auf 5-HT, unabhängig von OCT1 und 2. 5-HT bewirkt auf zwei unterschiedlichen Wegen eine Kontraktion, nämlich indirekt über Freisetzung eines non-cholinergen konstriktorischen Faktors und direkt über Stimulation der 5-HT-Rezeptoren. Eine Hemmung dieses Mechanismus ist mit dem Glucocorticoid Corticosteron (1  $\mu$ M) durch Blockade des OCT3 möglich, wodurch der OCT-Subtyp OCT3 indirekt an der 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion beteiligt ist.

## 7 Summary

A number of studies have shown that murine airways are responsive to serotonin (5-HT) and acetylcholine (ACh). In mice the effect of 5-HT-induced bronchoconstriction may be mediated by indirect mechanisms such as release of ACh [1]. Moffatt and coworkers suggested that constriction of the murine trachea evoked by 5-HT depends on ACh released from the epithelium [3]. Lips et al. [8] reported recently that OCT-subtypes OCT1, OCT2 and OCT3 are expressed in the ciliated respiratory epithelium of rats and showed that ACh is transported by OCT1 and OCT2, but not by OCT3. Hence, we suggested that 5-HT-induced bronchoconstriction is mediated by release of ACh from epithelial cells via OCTs. To address this issue we used videomicroscopy and digital imaging of precision-cut lung slices (PCLS) from wild-type mice, OCT3-deficient mice and OCT1/2 double-knockout mice. To assess the cholinergic component of the 5-HT induced bronchoconstriction we utilized muscarinic receptor 2/3 double-knockout mice, since bronchi of this strain are entirely unresponsive to cholinergic stimulation [15].

The absence of OCT1/2 had no significant effect on the 5-HT bronchoconstrictor response indicating that 5-HT-induced bronchoconstriction does not require the presence of OCT1 and 2. In all strains of wild-type mice, 5-HT (1  $\mu$ M) caused a bronchoconstriction that slightly exceeded that evoked by muscarine (1  $\mu$ M). However, this effect is not mediated by ACh, since 5-HT-induced bronchoconstriction was undiminished in muscarinic receptor MR2/3 double-knockout mice which were entirely unresponsive to muscarine. In OCT1/2<sup>-/-</sup> mice muscarine induced a bronchoconstriction that exceeded that caused by 5-HT indicating the existence of an OCT1/2 dependent release mechanism of a bronchodilating factor. 5-HT-induced bronchoconstriction was nearly completely blocked by atropine (10<sup>-4</sup> M), and this inhibitory effect persisted even in MR2/3<sup>-/-</sup> mice demonstrating the unspecificity of atropine at this dosage. Corticosterone (10<sup>-6</sup> M) significantly reduced 5-HT-induced bronchoconstriction in wild-type mice and OCT1/2<sup>-/-</sup> mice whereas this inhibitory effect was entirely abolished in OCT3<sup>-/-</sup> mice.

Collectively, these data demonstrate that 5-HT induces bronchoconstriction in mice by mediating release of an epithelium-derived constrictory factor which is not ACh and suggest the existence of a pulmonary OCT1- and M1 receptor-dependent pathway, which counteracts cholinergic bronchoconstriction. Furthermore, 5-HT-induced bronchoconstriction can be modified by corticosterone acting on OCT3, as demonstrated by its absence in OCT3<sup>-/-</sup> mice.

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] Eum SY, Norel X, Lefort J, Labat C, Vargaftig BB, Brink C (1999) Anaphylactic bronchoconstriction in BP2 mice: interactions between serotonin and acetylcholine. *Br J Pharmacol* 126: 312–316
- [2] Levitt RC, Mitzner W (1989) Autosomal recessive inheritance of airway hyperreactivity to 5-hydroxytryptamine. *J Appl Physiol* 67: 1125–1132
- [3] Moffatt JD, Cocks TM, Page CP (2004) Role of the epithelium and acetylcholine in mediating the contraction to 5-hydroxytryptamine in the mouse isolated trachea. *Br J Pharmacol* 141: 1159–1166
- [4] White SR, Kaliner MA, Barnes PJ, Kunkel GHH, Baraniuk JN, Dekker M (1994) Functional autonomic innervation of the airways: the cholinergic and adrenergic systems. *Neuropeptides, Respiratory Medicine, New York*. 21–56.
- [5] Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racké K (1998) Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. *Pharmacol Ther* 77: 59–79
- [6] Wessler I, Kirkpatrick CJ (2001) The non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in airways. *Pulm Pharmacol Ther* 14: 423–434
- [7] Reinheimer T, Bernedo P, Oelert H, Zeiske B, Racké K, Wessler I (1996) Acetylcholine in isolated airways of rat, guinea pig, and human: species differences in role of airway mucosa. *Am J Physiol* 270: 722–728
- [8] Lips KS, Volk C, Schmitt BM, Pfeil U, Arndt P, Miska D, Ermert L, Kummer W, Koepsell H (2005) Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33:79-88
- [9] Gründemann D, Goboulev V, Gambaryan S, Veyhl M, Koepsell H (1994) Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature* 372: 549-552
- [10] Wessler I, Roth E, Deutsch C, Brockerhoff P, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Kilbinger H (2001) Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters. *Br J Pharmacol* 134: 951-956



- [11] Schmitt A, Mössner R, Gossmann A, Fischer IG, Gorboulev V, Murphy DL, Koepsell H, Lesch KP (2003) Organic cation transporter capable of transporting serotonin is up-regulated in serotonin transporter-deficient mice *J Neurosci Res* 71:701-709
- [12] Chen JJ, Li Z, Pan H, Murphy DL, Tamir H, Koepsell H, Gershon MD (2001) Maintenance of serotonin in the intestinal mucosa and ganglia of mice that lack the high-affinity serotonin transporter: abnormal intestinal motility and the expression of organic cation transporters. *J Neurosci* 21: 6348–6361
- [13] Martin C, Uhlig S, Ullrich V (1996) Videomicroscopy of methacholine-induced contraction of individual airways in precision-cut lung slices. *Eur Respir J* 9: 2479–2487
- [14] Wohlsen A, Uhlig S, Martin C (2001) Immediate allergic response in small airways. *Am J Respir, Crit Care Med* 163: 1462-1469
- [15] Struckmann N, Schwering S, Wiegand S, Gschnell A, Yamada M, Kummer W, Wess J, Haberberger RV (2003) Role of muscarinic receptor subtypes in the constriction of peripheral airways: studies on receptor-deficient mice. *Mol Pharmacol* 64: 1444–1451
- [16] Jonker JW, Schinkel AH (2004) Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *J Pharmacol Exp Ther* 308: 2-9
- [17] Koepsell H (2004) Polyspecific organic cation transporters: their functions and interactions with drugs. *Pharmacol Sci* 25: 375-381
- [18] Schweifer N, Barlow DP (1996) The Lx1 gene maps to mouse chromosome 17 and codes for a protein that is homologous to glucose and polyspecific transmembrane transporters. *Mamm Genome* 7: 735-740
- [19] Gorboulev V, Ulzheimer JC, Akhoundova A, Ulzheimer-Teuber I, Karbach U, Quester S, Baumann C, Lang F, Busch AE, Koepsell H (1997) Cloning and characterization of two human organic cation transporters. *DNA Cell Biol* 16: 871-881
- [20] Terashita S, Dresser MJ, Zhang L, Gray AT, Yost SC, Giacomini KM (1998) Molecular cloning and functional expression of a rabbit renal organic cation transporter. *Biochem Biophys Acta* 1369: 1-6

- [21] Okuda M, Saito H, Urakami Y, Takano M, Inui K (1996) cDNA cloning and functional expression of a novel rat kidney organic cation transporter, OCT2. *Biochem Biophys Res Commun* 224: 500-507
- [22] Gründemann D, Babin-Ebell J, Martel F, Ording N, Schmidt A, Schömig E (1997) Primary structure and functional expression of the apical organic cation transporter from kidney epithelial LLC-PK1 cells. *J Biol Chem* 272: 10408-10413
- [23] Mooslehner KA, Allen ND (1999) Cloning of the mouse organic cation transporter 2 gene, Slc22a2, from an enhancer-trap transgene integration locus. *Mamm Genome* 10: 218-224
- [24] Zhang X, Evans KK, Wright SH (2002) Molecular cloning of rabbit organic cation transporter rbOCT2 and functional comparisons with rbOCT1. *Am J Renal Physiol* 283: F124-F139
- [25] Gründemann D, Schechinger B, Rappold GA, Schömig E (1998) Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter. *Nat Neurosci* 1: 349-351
- [26] Kekuda R, Prasad PD, Wu X, Wang H, Fei Y, Leibach FH, Ganapathy V (1998) Cloning and functional characterization of a potential-sensitive polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta. *J Biol Chem* 273: 15971-15979
- [27] Wu X, Kekuda R, Huang W, Fei Y, Leibach FH, Chen J, Conway SJ, Ganapathy V (1998) Identity of the organic cation transporter OCT3 as the extraneuronal monoamine transporter (uptake<sub>2</sub>) and evidence for the expression of the transporter in the brain. *J Biol Chem* 273: 32776-32786
- [28] Verhaagh S, Schweifer N, Barlow DP, Zwart R (1999) Cloning of the mouse and human solute carrier 22a3 (Slc22a3/SLC22A3) identifies a conserved cluster of three organic cation transporters on mouse chromosome 17 and human 6q26-q27. *Genomics* 55: 209-218
- [29] Koepsell H, Endou H (2004) The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Arch* 447: 666-676
- [30] Koepsell H, Schmitt BM, Gorboulev V (2003) Organic cation transporters *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 150: 36–90

- [31] Koepsell H (1998) Organic cation transporters in intestine, kidney, liver and brain. *Annu Rev Physiol* 60: 243–266
- [32] Urakami Y, Nakamura N, Takahashi K, Okuda M, Saito H, Hashimoto Y, Inui K (1999) Gender differences in expression of organic cation transporter OCT2 in rat kidney. *FEBS Lett* 461: 339–342
- [33] Urakami Y, Okuda M, Saito H, Inui K (2000) Hormonal regulation of organic cation transporter OCT2 expression in rat kidney. *FEBS Lett* 473: 173–176
- [34] Slitt AL, Cherrington NJ, Hartley DP, Leazer TM, Klaase CD (2002) Tissue distribution and renal developmental changes in rat organic cation transporter mRNA levels. *Drug Metab Dispos* 30: 212–219
- [35] Jonker JW, Wagenaar E, van Eijl S, Schinkel AH (2003) Deficiency in the organic cation transporters 1 and 2 (Oct1/Oct2 [Slc22a1/Slc22a2]) in mice abolishes renal secretion of organic cations. *Mol Cell Biol* 23: 7902–7908
- [36] Koepsell H, Gorboulev V, Arndt P (1999) Molecular pharmacology of organic cation transporters in kidney. *J Membrane Biol* 167: 103–117
- [37] Horvath G, Sutto Z, Torbati A, Conner GE, Salathe M, Wanner A (2003) Norepinephrine transport by the extraneuronal monomamine transporter in human bronchial arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285: 829–837
- [38] Sweet DH, Miller DS, Pritchard JB (2001) Ventricular choline transport – a role for organic cation transporter 2 expressed in choroid plexus. *J Biol Chem* 276: 41611–41619
- [39] Kimura H, Takeda M, Narikawa S, Enomoto A, Ichida K, Endou H (2002) Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate transport of prostaglandins. *J Pharmacol Exp Ther* 301: 293–298
- [40] Zwart Z, Verhaagh S, Buitelaar M, Popp-Snijders C, Barlow DP (2001) Impaired activity of the extraneuronal monoamine transporter system known as uptake-2 in Orct3/Slc22a3-deficient mice. *Mol Cell Biol* 21: 4188–4196

- [41] Iversen LL (1965) The uptake of catecholamines at high perfusion concentrations in the rat isolated heart: a novel catecholamine uptake process. *Br J Pharmacol*. 25: 18-33
- [42] Dresser MJ (2001) Transporters involved in the elimination of drugs in the kidney: organic anion transporters and organic cation transporters. *J Pharm Sci* 90: 397-421
- [43] Kerb R, Brinkmann U, Chatskaia N, Gorbunov D, Gorboulev V, Mornhinweg E, Keil A, Eichelbaum M, Koepsell H (2002) Identification of genetic variations of the human organic cation transporter hOCT1 and their functional consequences. *Pharmacogenetics* 12: 591–595
- [44] Lazar A, Gründemann D, Berkels R, Taubert D, Zimmermann T, Schömig E (2003) Genetic variability of the extraneuronal monoamine transporter EMT (SLC22a3). *J Hum Genet* 48: 226–230
- [45] Leabman MK, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Ferrin TE, De Young J, Taylor T, Clark AG, Herskowitz I (2002) Polymorphisms in a human kidney xenobiotic transporter, OCT2, exhibit altered function. *Pharmacogenetics* 12: 395–405
- [46] Leabman MK, Huang CC, De Young J, Carlson EJ, Taylor T, De La Cruz M, Johns SJ, Stryke D, Kawamoto M, Urban TJ (2003) Natural variation in human membrane transporter genes reveals evolutionary and functional constraints. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 5896–5901
- [47] Saito S, Iida A, Sekine A, Ogawa C, Kawauchi S, Higuchi S, Nakamura Y (2002) Catalog of 238 variations among six human genes encoding solute carriers (hSLCs) in the Japanese population. *J Hum Genet* 47: 576–584
- [48] Shu Y, Leabman MK, Feng B, Mangravite LM, Huang CC, Stryke D, Kawamoto M, Johns SJ, De Young J, Carlson EJ (2003) Evolutionary conservation predicts function of variants of the human organic cation transporter, OCT1. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 5902-5907
- [49] Jonker JW, Wagenaar E, Mol CA, Buitelaar M, Koepsell H, Smit JW, Schinkel AH (2001) Reduced hepatic uptake and intestinal excretion of organic cations in mice with a targeted disruption of the organic cation transporter 1 (Oct1 [SLC22a1]) gene. *Mol Cell Biol* 21: 5471-5477

- [50] Wang DS, Jonker JW, Kato Y, Kusuvara H, Schinkel AH, Sugiyama Y (2002) Involvement of organic cation transporter 1 in lactic acidosis caused by metformin. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 510–515
- [51] Gründemann D, Koster S, Kiefer N, Breidert T, Engelhardt M, Spitzenberger F, Obermüller N, Schömig E (1998) Transport of monoamine transmitters by the organic cation transporter type 2, OCT2. *J Biol Chem* 273: 30915-30920
- [52] Vialou V, Amphoux AR, Zwart R, Giros B, Gautron S (2004) Organic cation transporter 3 (Slc22a3) is implicated in salt-intake regulation. *J Neurosci* 24: 2846–2851
- [53] Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F, Kirkpatrick CJ (2001) The non-neuronal cholinergic system: the biological role of non-neuronal acetylcholine in plants and humans. *Jpn J Pharmacol* 85: 2–10
- [54] Metzen J, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Kilbinger H, Wessler I (2003) Proliferative effect of acetylcholine on rat trachea epithelial cells is mediated by nicotinic and muscarinic receptors of the M1-subtype. *Life Sci* 72: 2075–2080
- [55] Wong LB, Miller IF, Yeates DB (1988) Stimulation of ciliary beat frequency by autonomic agonists: in vivo. *J Appl Physiol* 65: 971–981
- [56] Pfeil U, Lips KS, Eberling L, Grau V, Haberberger RV, Kummer W (2003) Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the rat trachea. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28: 473–477
- [57] Okuda T, Haga T, Kanai Y, Endou H, Ishihara T, Katsura I (2000) Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nat Neurosci* 3: 120–125
- [58] Barnes PJ (2001) New treatments for chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pharmacol* 1: 217–222
- [59] Fryer AD, Jacoby DB (1998) Muscarinic receptors and control of airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 154–160
- [60] Caulfield MP, Birdsall NJM (1998) International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 50: 279-290

- [61] Fryer AD, el-Fakahany EE (1990) Identification of three muscarinic receptor subtypes in rat lung using binding studies with selective antagonists. *Life Sci* 47: 611-618
- [62] Barnes PJ, Chung KF, Page CP (1998) Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol Rev* 50: 515–596
- [63] Dandurand RJ, Wang CG, Phillips NC, Eidemann DH (1993) Responsiveness of individual airway to methacholine in adult lung explants. *J Appl Physiol* 75: 364-372
- [64] Richter M, Sirois P (2000) Effects of eicosanoids, neuromediators and bioactive peptides on murine airways. *Europ J Pharmacol* 389: 225-234
- [65] MacLagan J, Fryer AD, Faulkner D (1989) Identification of M1 muscarinic receptors in pulmonary sympathetic nerves in the guinea-pig by use of pirenzepine. *Br J Pharmacol* 97: 499–505
- [66] Spicuzza L, Basile L, Belvisi MG, Bellofiore S, Matera MG, Cazzola M, Di Maria GU (2002) The protective Role of epithelium-derived nitric oxide in isolated bovine trachea. *Pulm Pharmacol Ther* 15: 357–362
- [67] Kummer W, Wiegand S, Akinci S, Wessler I, Schinkel AH, Wess J, Koepsell H, Haberberger RV, Lips KS (2006) Role of acetylcholine and polyspecific cation transporters in serotonin-induced bronchoconstriction in the mouse. *Resp Res* 7: 65
- [68] Fan P, Weight FF (1994) The effect of atropine on the activation of 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> channels in rat nodose ganglion neurons. *Neurosci* 62: 1287-1292
- [69] Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K (1996) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 7. Auflage, *Spektrum Akademischer Verlag*

## Eigene Veröffentlichungen

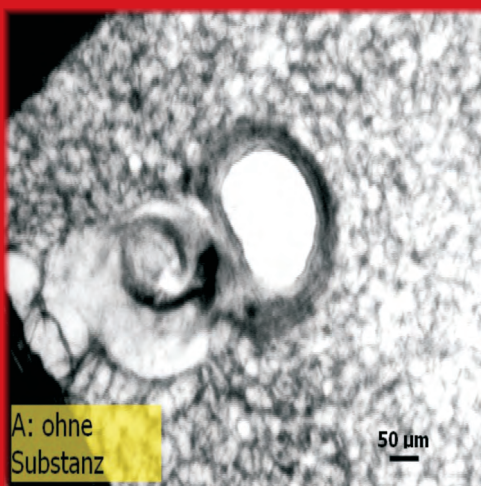
### **Abstracts:**

Kummer W, Lips KS, Akinci S, Wiegand S, Wess J, Koepsell H, Haberberger RV (2005) Serotonin-induced bronchoconstriction in the mouse is independent from acetylcholine release. *Autonom Neurosci: Basic Clin* 116: 106  
4<sup>th</sup> Congress International Society for Autonomic Neuroscience, Marseille, France, 2005

### **Originalarbeiten:**

Kummer W, Wiegand S, Akinci S, Wessler I, Schinkel AH, Wess J, Koepsell H, Haberberger RV, Lips KS (2006) Role of acetylcholine and polyspecific cation transporters in serotonin-induced bronchoconstriction in the mouse.  
*Resp Res* 7: 65

Pfaff M, Powaga N, Akinci S, Schütz W, Banno Y, Wiegand S, Kummer W, Wess J, Haberberger RV (2005) Activation of the SPHK/S1P signalling pathway is coupled to muscarinic receptor-dependent regulation of peripheral airways.  
*Resp Res* 6: 48-61



édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5104-1

